AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



# AESKULISA®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

# INSTRUCTION MANUAL

## AESKULISA® DGP-GA

Ref 3517

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 Βιβλιογραφία ..... 9
12 Ρυθμιστικά σύμβολα ..... 10

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*® DGP-GA** είναι μια ενζυμοανοσολογική μέθοδος στερεής φάσης, η οποία χρησιμοποιεί συνθετικά πεπτίδια που προέρχονται από απαμινωμένη γλιαδίνη για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων IgA και/ή IgG έναντι των πεπτιδίων απαμινωμένης γλιαδίνης (DGP) στον ανθρώπινο ορό.
Η ανάλυση είναι ένα εργαλείο για τη διάγνωση της νόσου κοιλιοκάκης (εντεροπάθεια λόγω δυσανοχής στη γλουτένη).

# 2 Κλινική εφαρμογή και αρχές της μεθόδου

Η εντεροπάθεια από γλουτένη ή κοιλιοκάκη χαρακτηρίζεται από ατροφία των λαχνών του λεπτού εντέρου, με αποτέλεσμα την «επιπέδωση» των λάχνων του εντερικού βλεννογόνου. Αιτία της ασθένειας είναι μία παθολογική δυσανεξία στη γλιαδίνη. Η γλιαδίνη είναι το διαλυτό σε αλκοόλη τμήμα της γλουτένης, ενός συστατικού στοιχείου του σιταριού, της σίκαλης και του κριθαριού.
Η ασθένεια επάγεται με τη λήψη γλουτένης. Ως θεραπεία πρέπει να διατηρείται εφ' όρου ζωής μία ελεύθερη σε γλουτένη δίαιτα, διότι τα συμπτώματα εμφανίζονται πάντοτε όταν λαμβάνεται εκ νέου γλουτένη. Η κοιλιοκάκη συσχετίζεται με το HLA, >95% των ασθενών κωδικοποιούν το DQ2 με DQA1*0501 και DQB1*0201. Η νόσος είναι δυνατό να εκδηλωθεί σε όλες τις ηλικίες, ωστόσο όμως εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στην πρώιμη παιδική ηλικία, εν μέρει ήδη σε νεογνά. Η συχνότητά της ανέρχεται σε 1/ 4000 έως και 1/ 300 στην Ευρώπη.
Η διάγνωση τίθεται τελικά μέσω της βιοψίας του λεπτού εντέρου, όπου ανευρίσκεται το κλασσικό «επίπεδο» βλεννογόνο, συνοδευόμενη από δείκτες ορού. Τα αντισώματα έναντι της γλιαδίνης και της ιστικής τρανσγλουταμινάσης (tTG) έχουν αποκτήσει εδώ ιδιαίτερη σημασία. Η tTG έχει αναγνωριστεί ως αντιγόνο – στόχος των EMA.
Πρόσφατες εργασίες έχουν αποδείξει ότι τα αντισώματα που αντιδρούν στη γλιαδίνη από ασθενείς που πάσχουν από κοιλιοκάκη δεσμεύουν έναν πολύ περιορισμένο αριθμό συγκεκριμένων επίτοπων στο μόριο της γλιαδίνης.7,8 Η επιλεκτική απαμίνωση της γλιαδίνης από την τρανσγλουταμινάση ιστού προκαλεί ενισχυμένη δέσμευση από τα αντισώματα αντι-γλιαδίνης. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν απαμινωμένα και καθορισμένα πεπτίδια έχουν αποδείξει ότι παρέχουν υψηλότερη διαγνωστική ακρίβεια για τη νόσο κοιλιοκάκη σε σύγκριση με τις τυπικές μεθόδους αντι-γλιαδίνης.9, 10, 11
Τα EMA είναι αντισώματα , τα οποία συνδέονται με το ενδομύσιο, ένα εξωκυτταρικό συστατικό των λείων μυών. Η διαπίστωσή τους με τη δοκιμασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFT) ήταν έως τώρα ένα σημαντικό βοηθητικό μέσο στη διάγνωση της κοιλιοκάκης.
Επιπλέον, τα αντισώματα σε γλιαδίνη και DGP ενδέχεται να είναι ο μόνος ορολογικός δείκτης στα νεογνά, καθώς τα αυτοαντισώματα αντί-tTG και EMA δεν εμφανίζονται σε αυτήν την ηλικία.
Στα νεογνά έχει ιδιαίτερη σημασία ο προσδιορισμός αντισωμάτων έναντι της γλιαδίνης, εφόσον δεν υπάρχουν ακόμη αυτοαντισώματα έναντι της tTG και των EMA σε αυτήν την ηλικία.

**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 | Ανθρώπινος ορός (διαλυμένος), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό) |
| Θετικός ορός ελέγχου | 1 x 1,5ml | Κόκκινο | Κίτρινο | Ανθρώπινος ορός (διαλυμένος), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό) |
| Αντιδραστήριο βαθμονόμησης οριακής τιμής | 1 x 1,5ml | Μπλε | Κίτρινο | Ανθρώπινος ορός (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. Ανθρώπινος ορός (διαλυμένος), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό) |
| Συζεύγματα, IgG<br>IgA | 1 x 15ml<br>1x15ml | Μπλε<br>Κόκκινο | Μπλε<br>Κόκκινο | Συστατικό στοιχείο: Αντι – ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη 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. |

* Color increasing with concentration

| ***MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED*** |
|---|
| Microtiter plate reader 450 nm reading filter and recommended 620 nm reference filter (600-690 nm). Glass ware (cylinder 100-1000ml), test tubes for dilutions. Vortex mixer, precision pipettes (10, 100, 200, 500, 1000 µl) or adjustable multipipette (100-1000µl). Microplate washing device (300 µl repeating or multichannel pipette or automated system), adsorbent paper. Our tests are designed to be used with purified water according to the definition of the United States Pharmacopeia (USP 26 - NF 21) and the European Pharmacopeia (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. 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 ανθρώπινης προέλευσης που περιέχονται σε αυτό το προϊόν (οροί ελέγχου και αντιδραστήρια βαθμονόμησης) αποδείχτηκαν κατά τον έλεγχο για ηπατίτιδα Β αντιγόνο επιφάνειας (HbsAg), ηπατίτιδα C και HIV 1 και 2 ως αρνητικά. Όμως, σε προϊόντα ανθρώπινης 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

In case that the product information, including the labeling, is defective or incorrect please contact the manufacturer or the supplier of the test kit.

Δεν πρέπει να ανταλλάσσονται μεμονωμένα συστατικά διάφορων παρτίδων και εργαλεία της δοκιμασίας, διότι αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση των αποτελεσμάτων.

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 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

**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:

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Σε περίπτωση που πρόκειται να προσδιοριστούν διάφορες κατηγορίες αντισωμάτων (IgG και IgA) παράλληλα, τα αντιδραστήρια βαθμονόμησης, οι οροί ελέγχου και τα δείγματα πρέπει να πιπετάρονται χωριστά για κάθε κατηγορία αντισωμάτων.**

Για ΠΟΣΟΤΙΚΗ ερμηνεία

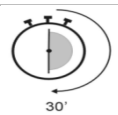
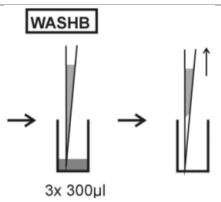
| | 1 | 2 | 3 | 4.. |
|---|---|---|---|---|
| **A** | Cal A | Cal E | P1 | |
| **B** | Cal A | Cal E | P1 | |
| **C** | Cal B | Cal F | P2 | |
| **D** | Cal B | Cal F | P2 | |
| **E** | Cal C | PC | P3 | |
| **F** | Cal C | PC | P3 | |
| **G** | Cal D | NC | … | |
| **H** | Cal D | NC | … | |

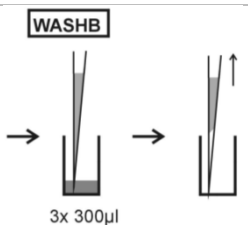
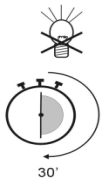
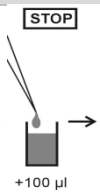
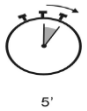
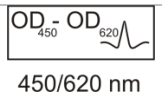
Για ΠΟΙΟΤΙΚΗ ερμηνεία

| | 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
CalB: calibrator B
CalC: calibrator C
CalD: calibrator D
CalE: calibrator E
CalF: calibrator F
PC: positive control
NC: negative control
CC: cut-off calibrator
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 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 IgG/A | OD 450/620 nm | CV % (Διακύμανση) |
|---|---|---|
| 0 U/ml | 0,039 | 0,0 |
| 3 U/ml | 0,135 | 1,1 |
| 10 U/ml | 0,313 | 3,2 |
| 30 U/ml | 0,552 | 3,6 |
| 100 U/ml | 1,187 | 3,5 |
| 300 U/ml | 2,031 | 3,2 |

***Παράδειγμα υπολογισμού***

| Ασθενής | Επανάληψη (OD) | Μέσος όρος (OD) | Αποτέλεσμα (U/ml) |
|---|---|---|---|
| P 01 | 1,017/1,029 | 1,023 | 85,6 |
| P 02 | 0,498/0,494 | 0,496 | 29,4 |

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:** $0.8 \times OD_{cut\text{-}off} \leq OD_{ασθενή} \leq 1.2 \times OD_{cut\text{-}off}$

**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: | 1,0 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

Δοκιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος 30 φορές σε ***AESKULISA***® **DGP-GA** δίνει αναλυτική ευαισθησία 1,0 U/ml.

## 10.2 Ειδικότητα και Ευαισθησία

Οι μικροπλάκες είναι επικαλυμμένες με συνθετικά πεπτίδια που προέρχονται από απαμινωμένη γλιαδίνη. Δε διαπιστώνονται αντιδραστικότητες διασταύρωσης με άλλα αντιγόνα.

## 10.3 Γραμμικότητα

Για επιλεγμένους ορούς μπόρεσε να εξακριβωθεί μία γραμμική συνάρτηση μεταξύ της αραίωσης και της συγκέντρωσης των αντισωμάτων σε αυτή τη δοκιμασία. Λόγω των ετερογενών ανθρώπινων αντισωμάτων όμως, δεν είναι δυνατό να αποκλειστεί το γεγονός ότι μεμονωμένοι οροί παρουσιάζουν μη γραμμική συμπεριφορά.

| Αριθμ. Δείγματος | Αραίωση | μετρημένη συγκέντρωση (U/ml) | αναμενόμενη συγκέντρωση (U/ml) | Ανάκτηση (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 / 100 | 66,1 | 64,8 | 102,1 |
| | 1 / 200 | 33,6 | 32,4 | 103,7 |
| | 1 / 400 | 14,1 | 16,2 | 87,0 |
| | 1 / 800 | 7,3 | 8,1 | 90,1 |
| 2 | 1 / 100 | 25,3 | 23,2 | 109,1 |
| | 1 / 200 | 11,7 | 11,6 | 100,9 |
| | 1 / 400 | 4,8 | 5,8 | 82,8 |
| | 1 / 800 | 2,5 | 2,9 | 86,2 |

## 10.4 Ακρίβεια

Για τον έλεγχο ακρίβειας της μεθόδου εξακριβώθηκε με τρεις ορούς σε διαφορετικές περιοχές της πρότυπης καμπύλης η εσωτερική και ενδιάμεση διακύμανση.

| Εσωτερική μέθοδος | | |
|---|---|---|
| **Αριθμ. δείγματος** | **Μέσος όρος (U/ml)** | **CV (%)** |
| 1 | 24,8 | 2,6 |
| 2 | 71,5 | 3,9 |
| 3 | 140,6 | 3,6 |

| Ενδιάμεση μέθοδος | | |
|---|---|---|
| **Αριθμ. δείγματος** | **Μέσος όρος (U/ml)** | **CV (%)** |
| 1 | 28,2 | 1,1 |
| 2 | 82,8 | 5,1 |
| 3 | 168,7 | 3,9 |

## 10.5 Διακρίβωση

Το ποσοτικό σύστημα μέτρησης λόγω έλλειψης ενός διεθνούς πρότυπου αναφοράς έχει διακριβωθεί με προσωρινές μονάδες μέτρησης. Τα αποτελέσματα δίδονται σε U/ml.

# 11 Βιβλιογραφία

**Schwertz E**, et al.: Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. Clinical Chemistry 50: 2370-2375, 2004.

**Osman AA**, et al.: B-Cell epitopes of gliadin. Clin Exp Immunol 121: 248-254, 2000.

**Mothes T**.: Deamidated gliadin peptides as targets for celiac disease-specific antibodies. Adv Clin Chem. 2007; 44: 35-63.

**Aleanzi M, et al**.: Celiac disease: Antibody recognition against native and selectively deamidaion gliadin peptides. Clinical Chemistry 47: 2023-2028, 2001.

# 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 | |