



AESKULISA[®]
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

**INSTRUCTION
MANUAL**

AESKULISA[®] LC-1

Ref 3702





Product Ref.	3702
Product Desc.	LC-1
Manual Rev. No.	004: 2025-02-27

Οδηγίες χρήσης

Περιεχόμενα

1	Ενδειγμένη 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



1 Ενδειγμένη χρήση

AESKULISA® LC-1 είναι μία Ενζυμοανοσολογική μέθοδος στερεής φάσης που περιέχει ανασυνδυασμένη ανθρώπινη φορμιμινοτρανσφεράση - κυκλοδεαμινάση (κυτοσολικό ηπατικό αντιγόνο) για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό αντι-ηπατικών-κυτοσολικών αντισωμάτων τύπου I (αντι-LC-1) στον ανθρώπινο ορό. Η δοκιμασία εξυπηρετεί στο να τεθεί η διάγνωση της αυτοάνοσης ηπατίτιδας (ΑΙΗ).

2 Κλινική εφαρμογή και αρχές της μεθόδου

Η αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΙΗ) είναι μία χρόνια προοδευτική ηπατική νόσος αγνώστου αιτιολογίας, η οποία ανταποκρίνεται καλά στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία, χωρίς θεραπευτική αγωγή όμως, έχει κακή πρόγνωση. Για το λόγο αυτό είναι πολύ σημαντική η πρώιμη και σίγουρη διάγνωση. Η ΑΙΗ χαρακτηρίζεται από την ιστολογική εικόνα μίας περιπυλαίας ηπατίτιδας με απουσία ιικών δεικτών, υπεργαμμασφαιριναιμία και στην πλειοψηφία των ασθενών, την παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό. Τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA), τα αντισώματα έναντι των λείων μυών (SMA, smooth-muscle antibodies), τα αντισώματα έναντι των ηπατικών και νεφρικών μικροσωμάτων (LKM, liver kidney microsomes) και τα αντισώματα έναντι διαλυτού ηπατικού αντιγόνου (SLA, soluble liver antigen) είναι αντισώματα – δείκτες για την ΑΙΗ. 52% των ασθενών με ΑΙΗ παρουσιάζουν θετικά ANA και/ ή SMA, 20% θετικά SLA και 3% έχουν αντισώματα LKM –1. Όλα αυτά τα αντισώματα έχουν μεγάλη αξία για τη διάγνωση της ΑΙΗ, όμως τα μοναδικά αυτοαντισώματα μέχρι σήμερα που παρουσιάζουν υψηλή ειδικότητα για την ΑΙΗ είναι μόνον τα SLA – αυτοαντισώματα. Τα ANA/SMA εμφανίζονται και στο 10-15% των ασθενών με ιογενής ηπατίτιδα ή άλλες ανοσοποιητικές παθήσεις. Τα LKM-1 ανευρίσκονται και σε ασθενείς που πάσχουν από ηπατίτιδα C.

Η σχετιζόμενη με τα αντι- LKM-1 ΑΙΗ είναι λιγότερο συχνή απ' ότι η θετική σε ANA/SMA/SLA ΑΙΗ και εμφανίζεται κυρίως στην παιδική ηλικία, και μάλιστα περισσότερο σε κορίτσια ηλικίας 2 έως 14 ετών. Η έναρξή της είναι συνήθως οξεία και μπορεί να εξελιχθεί σύντομα σε κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια.

Τα αντι - LC-1 αυτοαντισώματα περιγράφονται στο 30% των ασθενών με ΑΙΗ θετική στα αντι- LKM-1, στο 10% των περιπτώσεων ηπατίτιδας ΑΗΙ εμφανίζονται ως μεμονωμένα κυκλοφορούντα σχετιζόμενα με το ήπαρ αυτοαντισώματα. Ως αντιγόνο –στόχος αναγνωρίστηκε η φορμιμινοτρανσφεράση – κυκλοδεαμινάση (FTCD), ένα ειδικό μεταβολικό ένζυμο του ήπατος. Η FTCD είναι μία πρωτεΐνη με διπλή λειτουργία, η οποία αποτελείται από δύο σφαιρικές περιοχές, την περιοχή FT και την περιοχή CD, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με έναν βραχύ σύνδεσμο. Η αντιδραστικότητα των αντισωμάτων αντι-LC-1 τάσσεται ενάντια σε πολλές περιοχές που βρίσκονται επάνω στην FTCD, κυρίως όμως ενάντια σε ευαίσθητα για τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης επίτοπα της περιοχής FT.

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 συνδεδεμένα 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 συνδεδεμένων 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 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	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 αντιδραστήριου βαθμονόμησης: 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml. Ανθρώπινος ορός (διαλυμένος), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
Συζεύγματα, IgG	1 x 15ml	Μπλε	Μπλε	Συστατικά στοιχεία: Αντι-ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη σημαδεμένη με υπεροξειδάση από ραφανίδα, αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)
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, 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 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 προχοίδα (πιπέτα) 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

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 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 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:

Για ΠΟΣΟΤΙΚΗ ερμηνεία					Για ΠΟΙΟΤΙΚΗ ερμηνεία				
	1	2	3	4..		1	2	3	4...
A	Cal A	Cal E	P1		A	NC	P2		
B	Cal A	Cal E	P1		B	NC	P2		
C	Cal B	Cal F	P2		C	CC	P3		
D	Cal B	Cal F	P2		D	CC	P3		
E	Cal C	PC	P3		E	PC	...		
F	Cal C	PC	P3		F	PC	...		
G	Cal D	NC	...		G	P1	...		
H	Cal D	NC	...		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

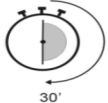
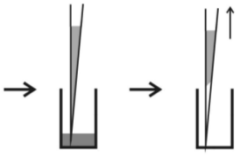
CalC: calibrator C


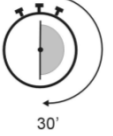
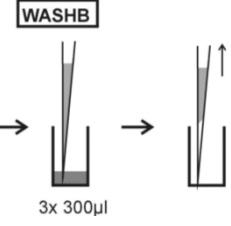
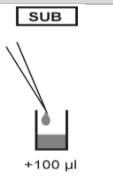
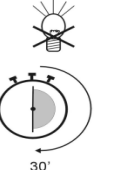
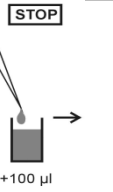
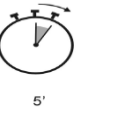
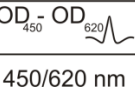
CalF: calibrator F

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.	<p>Βάζετε στα προβλεπόμενα βυθίσματα 100 μl από ένα από τα παρακάτω υλικά χρησιμοποιώντας την πιπέτα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.2 παραπάνω:</p> <ol style="list-style-type: none"> Αντιδραστήρια βαθμονόμησης (CAL.A έως CAL.F) για ΠΟΣΟΤΙΚΗ ερμηνεία ή Αντιδραστήριο βαθμονόμησης οριακής τιμής (CC) για ΠΟΙΟΤΙΚΗ ερμηνεία <p>Επίσης, βάζετε από 100 μl από καθένα από τα παρακάτω:</p> <ul style="list-style-type: none"> Αρνητικός ορός ελέγχου (NC) και θετικός ορός ελέγχου (PC) καθώς και Διαλυμένο ορό ασθενών (P1, P2...)
4.	 <p>Επιπλάζετε για 30 λεπτά σε 20-32 °C/ 68-89,6 °F.</p>
5.	 <p>Πλένετε 3 φορές, κάθε φορά με 300 μl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (αραιωμένο 1:50).</p>

6.		<p>Βάζετε 100 μl διαλύματος συζεύγματος σε κάθε υποδοχέα χρησιμοποιώντας πιπέτα.</p>
7.		<p>Επωάζετε για 30 λεπτά σε 20-32 °C/ 68-89,6 °F.</p>
8.		<p>Πλένετε 3 φορές, κάθε φορά με 300 μl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (αραιωμένο 1:50).</p>
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ		
9.		<p>Βάζετε 100 μl διαλύματος υποστρώματος TMB σε κάθε υποδοχέα χρησιμοποιώντας την πιπέτα.</p>
10.		<p>Επωάζετε για 30 λεπτά σε 20-32 °C/ 68-89,6 °F. Προστατεύστε από το έντονο φως.</p>
ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΙΑΚΟΠΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ		
11.		<p>Βάζετε 100 μl διαλύματος διακοπής αντίδρασης σε κάθε βύθισμα με τη σειρά που τοποθετήθηκε το υπόστρωμα χρησιμοποιώντας την πιπέτα.</p>
12.		<p>Επωάζετε για 5 λεπτά τουλάχιστον.</p>
13.		<p>Ανακινείτε προσεκτικά την πλάκα για 5 δευτερόλεπτα.</p>
14.		<p>Μετρήστε την απορρόφηση στα 450 nm εντός 30 λεπτών (συνιστάται προαιρετικά και στα 450/620 nm).</p>

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	OD 450/620 nm	CV % (Διακύμανση)
0 U/ml	0,046	2,4
3 U/ml	0,171	2,6
10 U/ml	0,372	1,0
30 U/ml	0,698	3,8
100 U/ml	1,456	0,4
300 U/ml	2,396	2,0

Παράδειγμα υπολογισμού

Ασθενής	Επανάληψη (OD)	Μέσος όρος (OD)	Αποτέλεσμα (U/ml)
P 01	1,254/1,208	1,231	74,4
P 02	0,658/0,644	0,651	25,8

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 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.

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. Όλα τα δείγματα με υψηλότερες τιμές θεωρούνται θετικά, δείγματα με χαμηλότερες τιμές αρνητικά.

Αρνητικό: $OD_{ασθενή} < 0.8 \times OD_{cut-off}$
Απροσδιόριστα: $0.8 \times OD_{cut-off} \leq OD_{ασθενή} \leq 1.2 \times OD_{cut-off}$
Θετικό: $OD_{ασθενή} > 1.2 \times OD_{cut-off}$

9 Τεχνικά στοιχεία

Υλικό δειγμάτων:	Ορός
Όγκος δειγμάτων:	10 μl ορός για αραιώση 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® LC-1** δίνει αναλυτική ευαισθησία 1,0 U/ml.

10.2 Ειδικότητα και Ευαισθησία

Η πλάκα μικροτιτλοποίησης είναι επικαλυμμένη με ανασυνδυασμένη ανθρώπινη φορμιμινοτρανσφεράση – κυκλοδεαμινάση. Δε διαπιστώνονται αντιδραστικότητες διασταύρωσης με άλλα αντιγόνα. Η διαγνωστική ειδικότητα ανέρχεται στα 99%. Η διαγνωστική ευαισθησία για την θετική σε LKM αυτοάνοση ηπατίτιδα (AIH-2) είναι 48%.

10.3 Γραμμικότητα

Για επιλεγμένους ορούς μπόρεσε να εξακριβωθεί μία γραμμική συνάρτηση μεταξύ της αραιώσης 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	Αραιώση	μετρημένη συγκέντρωση (U/ml)	αναμενόμενη συγκέντρωση (U/ml)	Ανάκτηση (%)
1	1 / 100	134,8	135,0	99,8
	1 / 200	66,3	67,5	98,2
	1 / 400	32,8	33,8	97,0
	1 / 800	15,8	16,9	93,5
2	1 / 100	98,5	100,0	98,5
	1 / 200	51,2	50,0	102,4
	1 / 400	25,3	25,0	101,2
	1 / 800	11,5	12,5	92,0

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	143,0	3,2
2	83,0	4,1
3	19,0	3,8

Ενδιάμεση μέθοδος		
Αριθμ. δείγματος	Μέσος όρος (U/ml)	CV (%)
1	141,0	2,8
2	85,0	4,2
3	23,0	5,1

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

Krawitt EL (1996). Autoimmune Hepatitis. N Engl J Med 334: 897-903.

Meyer zum Büschenfelde KH, Lohse AW (1995). Autoimmune Hepatitis. N Engl J Med 333: 1004-1005.





















Alvarez F, Berg PA, Bianchi et al. (1999). International Autoimmune Hepatitis Group Report: a review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J Hepatol 31: 929-938.

Manns MP et al. (1991). LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450 IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. J Clin Invest 88: 1370-1378.

Lapierre P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F (1999). Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. Gastroenterology 116: 643-649.

Muratori L, Sztul E, Muratori P, Gao Y, Ripalti A, Ponti C, Lenzi M, Landini MP, Bianchi FB (2001). Distinct epitopes on formiminotransferase cyclodeaminase induce autoimmune liver cytosol antibody type 1. Hepatology 34: 494-501.

12 Ρυθμιστικά σύμβολα

	- 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
	- Numero d'ordine - Référence Catalogue - Bestellnummer - Número de catálogo	- Catalogue number - Numéro de catálogo - Αριθμός παραγγελίας
	- Descrizione lotto - Lot - Chargen Bezeichnung - Lote	- Lot - Lote - Χαρακτηρισμός παρτίδας
	- 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
	- 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 electrical instructions for use - Siga las instrucciones electrónicas de uso - Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Da utilizzarsi entro - Utilise avant le - Verwendbar bis - Utilizar antes de	- Use by - Utilizar antes de - Χρήση μέχρι
	- Conservare a 2-8°C (35.6-46.4°F) - Conserver à 2-8°C (35.6-46.4°F) - Lagerung bei 2-8°C (35.6-46.4°F) - Conservar entre 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F) - Conservar a 2-8°C (35.6-46.4°F) - Φυλάσσεται στους 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Prodotto da - Fabriqué par - Hergestellt von - Fabricado por	- Manufactured by - Fabricado por - Κατασκευάζεται από
	- Calibratore cut-off - Etalon Seuil - Grenzwert Kalibrator - Calibrador de cut-off	- Cut off Calibrator - Calibrador de cut-off - Οριακός ορός Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	- Controllo positivo - Contrôle Positif - Positiv Kontrolle - Controllo positivo	- Positive Control - Control Positivo - Θετικός ορός ελέγχου
	- Controllo negativo - Contrôle Négatif - Negativ Kontrolle - Controllo negativo	- Negative Control - Control Negativo - Αρνητικός ορός ελέγχου
	- Calibratore - Etalon - Kalibrator - Calibrador	- Calibrator - Calibrador - Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	- Coniugato - Conjugé - Konjugat - Conjugado	- Conjugate - Conjugado - Σύζευγμα
	- Micropietra rivestita - Microplaque sensibilisée - Beschichtete Mikrotiterplatte - Microplaca revestida	- Coated microtiter plate - Microplaca sensibilizada - Επικαλυμμένη μικροπλάκα
	- Tampone di lavaggio - Tampon de Lavage - Waschpuffer - Solução de lavagem	- Wash buffer - Solución de lavado - Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	- Tampone substrato - Substrat - Substratpuffer - Substrato	- Substrate buffer - Tampón sustrato - Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	- Reagente bloccante - Solution d'Arrêt - Stopreagenz - Solução de paragem	- Stop solution - Solución de parada - Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης
	- Tampone campione - Tampon Echantillons - Probenpuffer - Diluente de amostra	- Sample buffer - Tampón Muestras - Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων