

AESKULISA®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA Intrinsic Factor
Ref 3512



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



AESKU.DIAGNOSTICS GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim, Germany
Tel: +49-6734-9622-0
Fax: +49-6734-9622-2222
Info@aesku.com
www.aesku.com

Product Ref.	3512
Product Desc.	Intrinsic Factor
Manual Rev. No.	003 : 2015-06-05

1 Ενδεδιγμένη χρήση

AESKULISA Intrinsic Factor είναι μία Ενζυμοανοσολογική μέθοδος στερεής φάσης με ανασυνδυασμένο ανθρώπινο ενδογενή παράγοντα για την ποσοτική και ποιοτικό ανίχνευση αντισωμάτων IgG ενάντια του ενδογενή παράγοντα.

Η δοκιμασία είναι ένα εργαλείο για τη διάγνωση της κακοήθης αναιμίας (αναιμία Biermer).

2 Κλινική εφαρμογή και αρχές της μεθόδου

Η κακοήθης αναιμία είναι το τελικό στάδιο μιας αυτοάνοσης γαστρίτιδας (γαστρίτιδα τύπου A) με αποτέλεσμα την καταστροφή του γαστρικού βλεννογόνου. Ένα μικρό ποσοστό (10-15%) των ασθενών με αυτοάνοση γαστρίτιδα αναπτύσσει κακοήθης αναιμία. Η κακοήθης αναιμία είναι η πιο κοινή αιτία ανεπάρκειας βιταμίνης B12 στον πληθυσμό των Δυτικών χωρών. Προκαλείται από έλλειψη του ενδογενούς παράγοντα, μία γλυκοπρωτεΐνη, η οποία απαιτείται για την απορρόφηση της βιταμίνης B12 από το γαστροεντερικό σωλήνα. Ο ενδογενής παράγοντας παράγεται από τα γαστρικά τοιχωματικά κύτταρα. Η βιταμίνη B12, στη συνέχεια, είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Η κακοήθης αναιμία δεν εμφανίζεται συνήθως πριν από την ηλικία των 30 ετών. Η μέση ηλικία της διάγνωσης είναι τα 60 έτη. Στην πραγματικότητα, μια πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι σχεδόν 2 τοις εκατό των ατόμων άνω των 60 ετών πάσχουν από κακοήθης αναιμία. την ολέθρια αναιμία. Επιπλέον, προσβάλλονται ελαφρώς περισσότερες γυναίκες από άνδρες. Η ασθένεια μπορεί να εμφανιστεί σε όλες τις εθνικότητες, αλλά εμφανίζεται συχνότερα στους ανθρώπους με Σκανδιναβική ή Βόρεια Ευρωπαϊκή καταγωγής.

Τα αυτοαντισώματα στην κακοήθη αναιμία τάσσονται ενάντια των τοιχωματικών κυττάρων και του ενδογενή παράγοντα. Τα αντισώματα έναντι των τοιχωματικών κυττάρων είναι ευαίσθητα 80-90%, όμως μπορούν επίσης να ανιχνευθούν και σε ποσοστό έως 5% στον υγιή πληθυσμό. Τα αντισώματα έναντι του ενδογενούς παράγοντα παρουσιάζουν ευαισθησία 50-70% με ειδικότητα 100% σε έναν πληθυσμό υγιών αιμοδοτών.

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.

 AESKU DIAGNOSTICS <small>THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS</small>	Product Ref.	3512
	Product Desc.	Intrinsic Factor
	Manual Rev. No.	003 : 2015-06-05

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 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	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 τετραμεθυλβενζίδινη και υπεροξειδίο του υδρογόνου (TMB/H ₂ O 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 επταναλαμβανόμενη 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 Φαρμακοποίας Ηνωμένων Πολιτειών (USP 26 - NF 21) και της Ευρωπαϊκής φαρμακοποίας (Eur.Ph. 4th ed.).

4 Φύλαξη και χρόνος διατήρησης

Τα αντιδραστήρια του συνόλου αντιδραστηρίων και η μικροπλάκα πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8°C/35-46°F μέσα στους αυθεντικούς περιέκτες. Αραιωμένα διαλύματα, φυλάσσονται στους 2-8°C/35-46°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.

Product Ref.	3512
Product Desc.	Intrinsic Factor
Manual Rev. No.	003 : 2015-06-05

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 αζίδιων. 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 (օροί ελέγχου και αντιδραστήρια βαθμονόμησης) αποδείχτηκαν κατά τον έλεγχο για ηπατίτιδα B 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 αναμείτε 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.

Product Ref.	3512
Product Desc.	Intrinsic Factor
Manual Rev. No.	003 : 2015-06-05

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, λιπαίμικά, 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/35-46°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 καπτακιών 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 ml ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων + 10 ml 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 ml 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/35-46°F).

7.2 Σχήμα διανομής αντιδραστηρίων

Προτείνουμε τη χρήση της πιπέτας για αντιδραστήρια βαθμονόμησης, ορούς ελέγχου και δειγμάτα 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

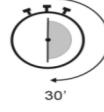
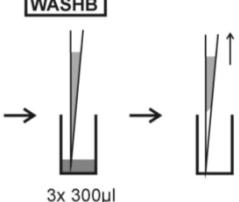
CalC: calibrator C

CalF: calibrator F

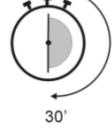
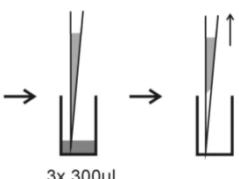
CC: cut-off calibrator

P3: patient 3

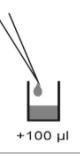
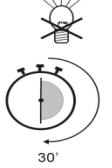
7.3 Βήματα εργασίας

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.	 Βάζετε στα προβλεπόμενα βυθίσματα 100 µl από ένα από τα παρακάτω υλικά χρησιμοποιώντας την πιπέτα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.2 παραπάνω: <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.	 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).

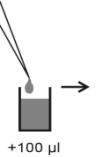
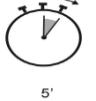
ΣΥΖΕΥΓΜΑ

6.	CONJ  +100 µl	<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.	WASHB  3x 300µl	<p>Πλένετε 3 φορές, κάθε φορά με 300 µl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (αραιωμένο 1:50).</p>

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

9.	SUB  +100 µl	<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.	STOP  +100 µl	<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.	 450/620 nm	<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	0,041	0,4
3 U/ml	0,164	2,5
10 U/ml	0,322	2,2
30 U/ml	0,615	1,3
100 U/ml	1,239	3,0
300 U/ml	2,141	1,3

Παράδειγμα υπολογισμού

Ασθενής	Επανάληψη (OD)	Μέσος όρος (OD)	Αποτέλεσμα (U/ml)
P 01	1,275 / 1,259	1,267	101,0
P 02	0,668 / 0,673	0,671	34,3

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.

$$\begin{array}{llll}
 \text{Αρνητικό:} & OD_{\text{ασθενή}} & < & 0.8 \times OD_{\text{cut-off}} \\
 \text{Απροσδιόριστα:} & 0.8 \times OD_{\text{cut-off}} & \leq & OD_{\text{ασθενή}} \leq 1.2 \times OD_{\text{cut-off}} \\
 \text{Θετικό:} & OD_{\text{ασθενή}} & > & 1.2 \times OD_{\text{cut-off}}
 \end{array}$$

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/35-46°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 Intrinsic Factor δίνει αναλυτική ευαισθησία 1,0 U/ml.

10.2 Ειδικότητα και Ευαισθησία

Οι μικροπλάκες είναι επικαλυμμένες με ανασυνδυασμένο ανθρώπινο γαστρικό ενδογενή παράγοντα. Δεν έχουν διαπιστωθεί αντιδραστικότητες διασταύρωσης με άλλα αντιγόνα. Τα αντισώματα έναντι του ενδογενούς παράγοντα παρουσιάζουν διαγνωστική ευαισθησία 50-70% για την κακοήθης αναιμία και ειδικότητα 100% σε έναν πληθυσμό υγιών αιμοδοτών. Τα αντισώματα έναντι των τοιχωματικών κυττάρων είναι ευαίσθητα 80-90%, όμως μπορούν επίσης να ανιχνευθούν και σε ποσοστό έως 5% στον υγιή πληθυσμό.

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	160,0	163,0	98,2
	1 / 200	79,08	81,5	97,9
	1 / 400	37,4	40,8	91,7
	1 / 800	18,9	20,4	92,6
2	1 / 100	101,0	104,0	97,1
	1 / 200	53,0	52,0	101,9
	1 / 400	28,0	26,0	107,7
	1 / 800	12,0	13,0	92,3

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	285,0	6,1
2	149,0	4,8
3	63,0	5,2

Ενδιάμεση μέθοδος		
Αριθμ. δείγματος	Μέσος όρος (U/ml)	CV (%)
1	279,0	4,8
2	159,0	3,2
3	58,0	5,6

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.

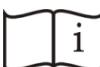
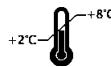
11 Βιβλιογραφία

Carmel, R. (1992). Reassessment of the relative prevalences of antibodies to gastric parietal cell and to intrinsic factor in patients with pernicious anaemia: influence of patient age and race. Clin Exp Immunol, 89: 74-77 (11): 2617-20.

Oh R, Brown DL (2003). Vitamin B12 deficiency. Am Fam Physician, 67: 979-986.

Toh Ban-Hock, Alderuccio, F. (2004). Pernicious anaemia Autoimmunity 37: 357-361.

Toh Ban-Hock, van Driel Ian R. (1997). Pernicious anaemia. NEJM Vol. 337: 1441-1448.

IVD	- Diagnosi in vitro - Pour diagnostic in vitro - In Vitro Diagnostikum - Para uso Diagnóstico in vitro	- For in vitro diagnostic use - Para uso diagnóstico in vitro - In Vitro Διαγνωστικό μέσο
REF	" Numero d'ordine " Référence Catalogue " Bestellnummer " Número de catálogo	" Cataloge number " Numéro de catálogo " Αριθμός παραγγελίας
LOT	" Descrizione lotto " Lot " Chargen Bezeichnung " Lote	" Lot " Lote " Χαρακτηρισμός παρτίδας
CE	" Conformità europea " Déclaration CE de Conformité " Europäische Konformität " Declaração CE de Conformidade	" EC Declaration of Conformity " Declaración CE de Conformidad " Ευρωπαϊκή συμφωνία
	" 96 determinazioni " 96 tests " 96 Bestimmungen " 96 Testes	" 96 tests " 96 pruebas " 96 προσδιορισμοί
	" Rispettare le istruzioni per l'uso " Voir les instructions d'utilisation " Gebrauchsanweisung beachten " Ver as instruções de uso	" See instructions for use " Ver las instrucciones de uso " Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης " Ver as instruções de uso
	" Da utilizzarsi entro " Utilisez avant le " Verwendbar bis " Utilizar antes de	" Use by " Utilizar antes de " Χρήση μέχρι " Utilizar antes de
	" Conservare a 2-8°C " Conserver à 2-8°C " Lagerung bei 2-8°C " Conservar entre 2-8°C	" Store at 2-8°C (35-46°F) " Conservar a 2-8°C " Φυλάσσεται στους 2-8°C " Conservar entre 2-8°C
	" Prodotto da " Fabriqué par " Hergestellt von " Fabricado por	" Manufactured by " Fabricado por " Κατασκευάζεται από " Fabricado por
CO-CAL	" Calibratore cut-off " Etalon Seuil " Grenzwert Kalibrator " Kalibrator de cut-off	" Cut off Calibrator " Calibrador de cut-off " Οριακός ορός Αντιδραστήριο βαθμονόμησης " Calibrador de cut-off
CON +	" Controllo positivo " Contrôle Positif " Positiv Kontrolle " Controlo positivo	" Positive Control " Control Positivo " Θετικός ορός ελέγχου " Controlo positivo
CON -	" Controllo negativo " Contrôle Négatif " Negativ Kontrolle " Controlo negativo	" Negative Control " Control Negativo " Αρνητικός ορός ελέγχου " Controlo negativo
CAL	" Calibratore " Etalon " Kalibrator " Calibrador	" Calibrator " Calibrador " Αντιδραστήριο βαθμονόμησης " Calibrador
RC	" Recupero " Corrélation " Wiederfindung " Recuperacão	" Recovery " Recuperado " Ανάκτηση " Recuperacão
CONJ	" Coniugato " Conjugé " Konjugat " Conjulado	" Conjugate " Conjugado " Σύζευγμα " Conjulado
MP	" Micropiastra rivestita " Microplaquette sensibilisée " Beschichtete Mikrotiterplatte " Microplaque revestida	" Coated microtiter plate " Microplaca sensibilizada " Επικαλυμμένη μικροπλάκα " Microplaque revestida
WASHB 50x	" Tampone di lavaggio " Tampon de Lavage " Waschpuffer " Solução de lavagem	" Wash buffer " Solución de lavado " Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης " Solução de lavagem
SUB	" Tampone substrato " Substrat " Substratpuffer " Substrato	" Substrate buffer " Tampón sustrato " Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος " Substrato
STOP	" Reagente bloccante " Solution d'Arrêt " Stopreagenz " Solucion de paragem	" Stop solution " Solución de parada " Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης " Solucion de paragem
SB 5x	" Tampone campione " Tampon Echantillons " Probenpuffer " Diluente de amostra	" Sample buffer " Tampón Muestras " Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων " Diluente de amostra