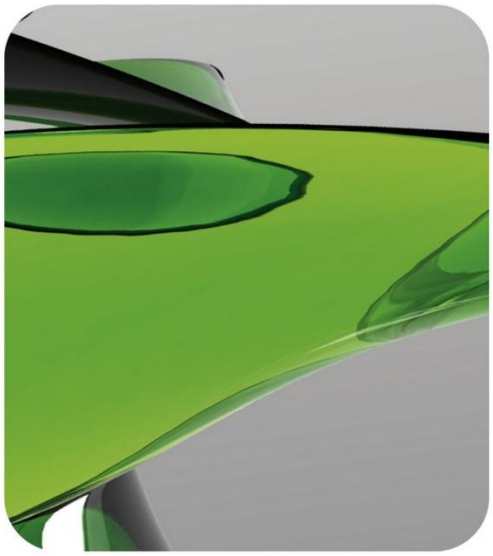
AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS





AESKULISA®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA Protein C

Ref 3901



DIN EN ISO 13485

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 8
9 Τεχνικά στοιχεία 9
10 Στοιχεία Απόδοσης 9
11 Βιβλιογραφία 11

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

1 Ενδεδειγμένη χρήση

AESKULISA Protein C είναι μια ενζυμοανοσολογική μέθοδος στερεής φάσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης C σε ανθρώπινο πλάσμα στο οποίο έχουν προστεθεί κιτρικά. Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης C εξυπηρετεί στην εκτίμηση του κινδύνου θρομβώσεως.

2 Κλινική εφαρμογή και αρχές της μεθόδου

Η πρωτεΐνη C είναι ένα ανενεργό ζυμογόνο που εξαρτάται από τη βιταμίνη K μιας πρωτεάσης σερίνης της οποίας η σύνθεση γίνεται κυρίως από τα ηπατοκύτταρα στο ήπαρ. Το μοριακό βάρος της είναι 62 kDa και εντοπίζεται με συγκέντρωση 4 μg/ml στο πλάσμα. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (aPC) είναι το βασικό στοιχείο του αντιπηκτικού συστήματος της πρωτεΐνης C που ενεργοποιείται από τη δέσμευση της θρομβίνης στην θρομβομοδουλίνη των μεμβρανικών υποδοχέων των ενδοθηλιακών κυττάρων. Το σύμπλεγμα της θρομβίνης και της θρομβομοδουλίνης ενεργοποιεί την πρωτεΐνη C και η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C με τη σειρά της σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με συμπαράγοντα την πρωτεΐνη S που εμφανίζει υψηλή συγγένεια ως προς τις φωσφολιπιδικές μεμβράνες. Το γεγονός είναι σημαντικό από άποψη φυσιολογίας καθώς η aPC αδρανοποιεί επιλεκτικά τους παράγοντες πηκτικότητας Va και VIIIa που δεσμεύονται στη μεμβράνη. Επιπλέον, η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C διαθέτει προινωδολυτική δραστηριότητα καθώς αναστέλλει τον αναστολέα του ενεργοποιητή της πλασμίνης-1 (PAI-1). Η ανεπάρκεια πρωτεΐνης C μπορεί να είναι κληρονομική ή επίκτητη και συσχετίζεται με μεταβλητά αυξανόμενο κίνδυνο θρομβώσεως. Ο επιπολασμός της ανεπάρκειας πρωτεΐνης C στο γενικό πληθυσμό έχει εκτιμηθεί σε ένα περιστατικό στα 300. Σχεδόν 50-80% των ατόμων με κληρονομική ανεπάρκεια πρωτεΐνης C θα αντιμετωπίσουν θρομβωτικό επεισόδιο πριν από την ηλικία των 30-45 ετών. Οι ασθενείς με ομοζυγωτική ανεπάρκεια πρωτεΐνης C μπορεί να παρουσιάσουν κεραυνοβόλο νεογνική πορφύρα ή εκτεταμένη φλεβοθρόμβωση. Η επίκτητη ανεπάρκεια πρωτεΐνης C συσχετίζεται συχνά με ηπατική νόσο, εγχείριση, αντιπηκτική θεραπεία από το στόμα, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο κ.λπ. Η ανεπάρκεια πρωτεΐνης C ταξινομείται σε δύο καταστάσεις. Η ανεπάρκεια τύπου I είναι μια μείωση στο επίπεδο της πρωτεΐνης C. Η ανεπάρκεια τύπου II χαρακτηρίζεται από μειωμένη δραστηριότητα πρωτεΐνης C, με φυσιολογικό επίπεδο αντιγόνου. Για να προσδιοριστεί ο τύπος της ανεπάρκειας, η εργαστηριακή διάγνωση της πρωτεΐνης C ενδεχομένως να απαιτεί τόσο τον προσδιορισμό των επιπέδων αντιγόνου όσο και λειτουργικό προσδιορισμό.

Αρχές της δοκιμασίας

Η πρωτεΐνη C AESKULISA είναι μια ELISA τύπου σάντουιτς που χρησιμοποιεί μικροπλάκες επικαλυμμένες με ένα αντίσωμα καθήλωσης ειδικό για την ανθρώπινη πρωτεΐνη C. Αραιωμένο πλάσμα ασθενούς σε αναλογία 1:51 επωάζεται στα βυθίσματα ώστε η πρωτεΐνη C να υπάρχει στο πλάσμα για τη δέσμευση του αντισώματος. Το μη δεσμευμένο κλάσμα απομακρύνεται με πλύση. Στη συνέχεια, αντιανθρώπινο αντίσωμα εντοπισμού πρωτεΐνης C συνδεδεμένο με horseradish περοξειδάση (σύζευγμα) επωάζεται και αντιδρά με το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος στην επιφάνεια μικροτιτλοδότησης. Κατόπιν της επώασης, το μη δεσμευμένο σύζευγμα απομακρύνεται με πλύση. Η προσθήκη υποστρώματος TMB παράγει μια ενζυμική χρωματομετρική (μπλε) αντίδραση, η οποία διακόπτεται με την προσθήκη αραιωμένου οξέως (το χρώμα γίνεται κίτρινο). Το ποσοστό σχηματισμού χρώματος από το χρωμογόνο μετρείται σε μονάδες οπτικής πυκνότητας με ένα φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Χρησιμοποιώντας μια καμπύλη που προετοιμάζεται από το πρότυπο πλάσματος που παρέχεται με το κιτ, μπορεί να προσδιοριστεί το σχετικό ποσοστό συγκέντρωσης αντιγόνου πρωτεΐνης C στο πλάσμα του 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)
πλάσμα αναφοράς	3 x 0,4ml	Λευκό		Συστατικά στοιχεία: Ανθρώπινο πλάσμα
έλεγχος „N“	3 x 0,2ml	Λευκό		Συστατικά στοιχεία: Ανθρώπινο πλάσμα
έλεγχος „D“	3 x 0,2ml	Λευκό		Συστατικά στοιχεία: Ανθρώπινο πλάσμα

ΕΤΟΙΜΑ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ				
Στοιχείο	Ποσότητα	Χρώμα καπακιού	Χρώμα διαλύματος	Περιγραφή / Περιεχόμενο
Συζεύγματα, IgG	1 x 15ml	Μπλε	Μπλε	Συστατικό στοιχείο: Αντι – ανθρώπινη Protein C 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.

* 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/35-46°F μέσα στους αυθεντικούς περιέκτες. Οι αραιωμένες λύσεις είναι ανθεκτικές - με την εξαίρεση του πλάσματος και των ελέγχων αναφοράς - με 4°C/39°F ένας μήνας. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στη συσκευασία και στις ετικέτες του κάθε συστατικού. Τα κοντρόλ παραμένουν σταθερά για 8 ώρες όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8°C/35-46°F.

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.

Το Πλάσμα αναφοράς και τα Κοντρόλ που περιλαμβάνονται σε αυτό το κιτ έχουν ελεγχθεί μέσω εγκεκριμένων μεθόδων και έχουν βρεθεί αρνητικά για HbsAg, Ηπατίτιδα C και HIV 1. Ωστόσο, κανένας έλεγχος δεν εγγυάται την πλήρη απουσία ιογενών παραγόντων σε τέτοιο υλικό. Επομένως, χειρίζεστε το Πλάσμα αναφοράς, τα Κοντρόλ και τα δείγματα των ασθενών ως ικανά να μεταδώσουν μολυσματικές νόσους και ακολουθείτε τους εθνικούς κανονισμούς.

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 23°C/73.4°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

Χρησιμοποιήστε επιλεκτικά φρέσκα δείγματα πλάσματος με προσθήκη κιτρικού νατρίου 3,2% ή 3,8% ως αντιπηκτικό. Η λήψη του αίματος πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τα εθνικά νομικά αξιώματα. Να μην χρησιμοποιούνται: ικτερικά, λιπαιμικά, αιμολυμένα ή μολυσμένα από βακτήρια δείγματα. Συλλέγετε τα δείγματα αίματος σε καθαρά, στεγνά και κενά φιαλίδια. Κατόπιν φυγοκέντρησης, τα δείγματα πλάσματος πρέπει να χρησιμοποιηθούν αμέσως, διαφορετικά πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8°C/35-46°F για οκτώ 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

Προετοιμασία πριν την εισαγωγή σε πιπέτα 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).

Πρότυπο πλάσματος:

Κάντε ανασύσταση του πρότυπου πλάσματος με την προσθήκη 0,4 ml αποσταγμένου νερού και ανακινήστε απαλά. Αφήστε το ανασυσταμένο πλάσμα να ηρεμήσει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Το πρότυπο πλάσματος παραμένει σταθερό για 8 ώρες όταν αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 2-8°C/35-46°F.

Κοντρόλ:

Κάντε ανασύσταση των κοντρόλ N και D με την προσθήκη 0,2 ml αποσταγμένου νερού και ανακινήστε απαλά. Αφήστε τα ανασυσταμένα κοντρόλ να ηρεμήσουν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Τα κοντρόλ παραμένουν σταθερά για 8 ώρες όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8°C/35-46°F.

Προαραίωση του πρότυπου πλάσματος:

Ετοιμάστε μία αραίωση 1:2 του ανασυσταμένου πλάσματος αναφοράς στο προαραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων (1x) και αναμείξτε καλά, π.χ. 100µl ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων+100µl πλάσμα.

Προετοιμασία για την πρότυπη καμπύλη:

Το σετ αραίωσης προετοιμάζεται με τη χρήση του προαραιωμένου πρότυπου πλάσματος.

Όγκος πρότυπου πλάσματος	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος	Επίπεδο αναφοράς
60 µl	1000 µl	150 %
40 µl	1000 µl	100 %
30 µl	1000 µl	75 %
20 µl	1000 µl	50 %
10 µl	1000 µl	25 %
10 µl	2000 µl	12.5 %

Αραίωση των δειγμάτων και των κοντρόλ:

Προσθέστε 20 µl πλάσματος σε 1000 µl ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος (1x) και αναμείξτε καλά.

Πλύση:

Απαιτούνται 20 ml αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος 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 της αυτόματης πιπέτας πρέπει να ληφθούν υπόψη πρόσθετες ποσότητες.

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/35-46°F).

7.2 Σχήμα διανομής αντιδραστηρίων

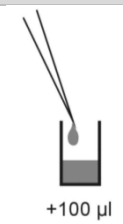
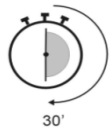
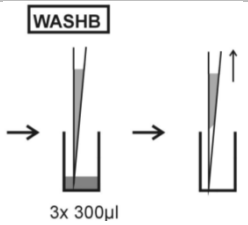
Προτείνουμε τη χρήση της πιπέτας για αντιδραστήρια βαθμονόμησης, ορούς ελέγχου και δείγματα ως εξής:

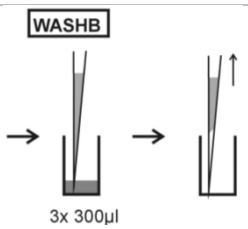
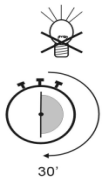
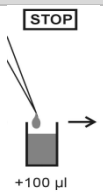
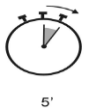
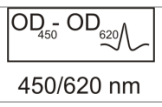
Για **ποσοτική ερμηνεία**, χρησιμοποιήστε τις αραιώσεις εργασίας του πρότυπου πλάσματος για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης.

	1	2	3	4...	
A	150	25	P1		
B	150	25	P1		
C	100	12.5	P2		
D	100	12.5	P2		
E	75	CD	P3		
F	75	CD	P3		
G	50	CN	...		
H	50	CN	...		

150: Reference Level 150 %
100: Reference Level 100 %
75: Reference Level 75 %
50: Reference Level 50 %
25: Reference Level 25 %
12.5: Reference Level 12.5 %
CD: control ‚deficient plasma
CN: control ‚normal plasma'
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 100 µl αραιωμένου πλάσματος από κάθε ασθενή στις προβλεπόμενες μικροτιτλοδοτήσεις χρησιμοποιώντας την πιπέτα. Βάζετε 100 µl αραιωμένου πλάσματος από κάθε ασθενή στις προβλεπόμενες μικροτιτλοδοτήσεις χρησιμοποιώντας την πιπέτα.
4.	 Επωάζετε για 30 λεπτά σε 20-26°C/68-78,8°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 20-26°C/68-78,8°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 20-26°C/68-78,8°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 μιας πρότυπης καμπύλης, στην οποία μεταφέρεται η οπτική πυκνότητα κάθε αραίωσης του πρότυπου πλάσματος (άξονας y) έναντι της αντίστοιχης τιμής του πρότυπου επιπέδου σε % (άξονας x). Για τον καλύτερο προσδιορισμό συνιστάται η μεταφορά log/lin και ένα Fit 4 παραμέτρων. Από την οπτική πυκνότητα κάθε δείγματος, εξακριβώνεται η αντίστοιχη σχετική τιμή ασθενούς εκφρασμένη σε %. Πολλαπλασιάστε τη σχετική τιμή ασθενούς που λαμβάνεται από την πρότυπη καμπύλη με τον καθορισμένο παράγοντα που θα βρείτε στο φυλλάδιο του ποιοτικού ελέγχου για να υπολογίσετε το επίπεδο αντιγόνου πρωτεΐνης C ως ποσοστό του φυσιολογικού.

Παράδειγμα προσδιορισμού

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

Παράδειγμα υπολογισμού

Πρότυπο επίπεδο	OD 450/620 nm	Αποτελέσματα (%)	CV % (Διακύμανση)
12.5 %	0,569	11,95	1,05
25 %	0,874	26,68	0,94
50 %	1,163	48,06	1,04
75 %	1,434	77,70	0,97
100 %	1,583	99,61	1,01
150 %	1,826	147,73	1,02

Ασθενής	Επανάληψη (OD)	Μέσος όρος (OD)	Σχετική τιμή ασθενούς (%)	Παράγοντας	Πρωτεΐνη C ασθενούς (%)
P 01	0,933/0,927	0,930	31,8	0,96	30,5
P 02	1,860/1,866	1,863	112,3	0,96	107,8

Τα δείγματα με τιμές μεγαλύτερες από το μέγιστο εύρος τιμών των αντιδραστηρίων βαθμονόμησης πρέπει να αναφέρονται ως" >Μέγ." Πρέπει να αραιώνονται κατάλληλα και να δοκιμάζονται ξανά. Τα δείγματα με τιμές μικρότερες από το εύρος τιμών των αντιδραστηρίων βαθμονόμησης πρέπει να αναφέρονται ως "<Ελάχ."

Ειδικά στοιχεία της παρτίδας, αναγράφονται στο συναπτόμενο πιστοποιητικό ελέγχου. Ιατρικά εργαστήρια μπορούν να διεξάγουν ελέγχους ποιότητος στο χώρο τους με δικούς τους ελέγχους και/ ή ορούς από την τράπεζα αίματος σύμφωνα με της ρυθμίσεις της Ε.Ε..

Συνιστάται σε κάθε εργαστήριο να δημιουργήσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές, βασισμένες στη δική του τεχνική, ελέγχους, εξοπλισμό και πληθυσμούς ασθενών.

Στην περίπτωση κατά την οποία οι τιμές των ορών ελέγχου δεν συμφωνούν με τα κριτήρια, η δοκιμή είναι άκυρη και θα πρέπει να επαναληφθεί.

Θα πρέπει να ελεγχθούν τα παρακάτω τεχνικά ζητήματα: Ημερομηνίες λήξης των αντιδραστηρίων (που προετοιμάστηκαν), συνθήκες αποθήκευσης, πιπέτες, συσκευές, φωτόμετρο, συνθήκες επώασης και μέθοδος πλύσης.

Εάν τα στοιχεία τα οποία υποβλήθηκαν σε δοκιμή παρουσιάζουν απόκλιση ή άλλου είδους διαφοροποίηση από τις αναμενόμενες τιμές ή εάν δεν πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας χωρίς εύλογη αιτία, επικοινωνήστε με τον κατασκευαστή ή τον προμηθευτή του κιτ δοκιμής.

Αναμενόμενες τιμές

Οι τιμές για την πρωτεΐνη C δίνονται σε σχετικό ποσοστό (%) σε σύγκριση με τη συγκέντρωση φυσιολογικού πλάσματος. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης C σε φυσιολογικό ανθρώπινο πλάσμα κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 70% και 140%.

Τα δείγματα με τιμές άνω της περιοχής της πρότυπης καμπύλης μπορούν να δοκιμαστούν ξανά σε υψηλότερες αραιώσεις για ακριβή αποτελέσματα. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθορίσει τη δική του περιοχή φυσιολογικών τιμών με βάση τις τεχνικές, τους ελέγχους, τον εξοπλισμό που χρησιμοποιεί και τον πληθυσμό ασθενών, σύμφωνα με τις εδραιωμένες διαδικασίες του.

9 Τεχνικά στοιχεία

Υλικό δειγμάτων:	πλάσμα
Όγκος δειγμάτων:	20 µl πλάσμα 1:51 με 1x ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
Ολικός χρόνος επώασης:	90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου 20-26°C/68-78,8°F
Περιοχή μέτρησης:	12.5-150 %
Αναλυτική Ευαισθησία:	6,0%
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 Protein C δίνει αναλυτική ευαισθησία 6,0 %.

10.2 Κλινική απόδοση

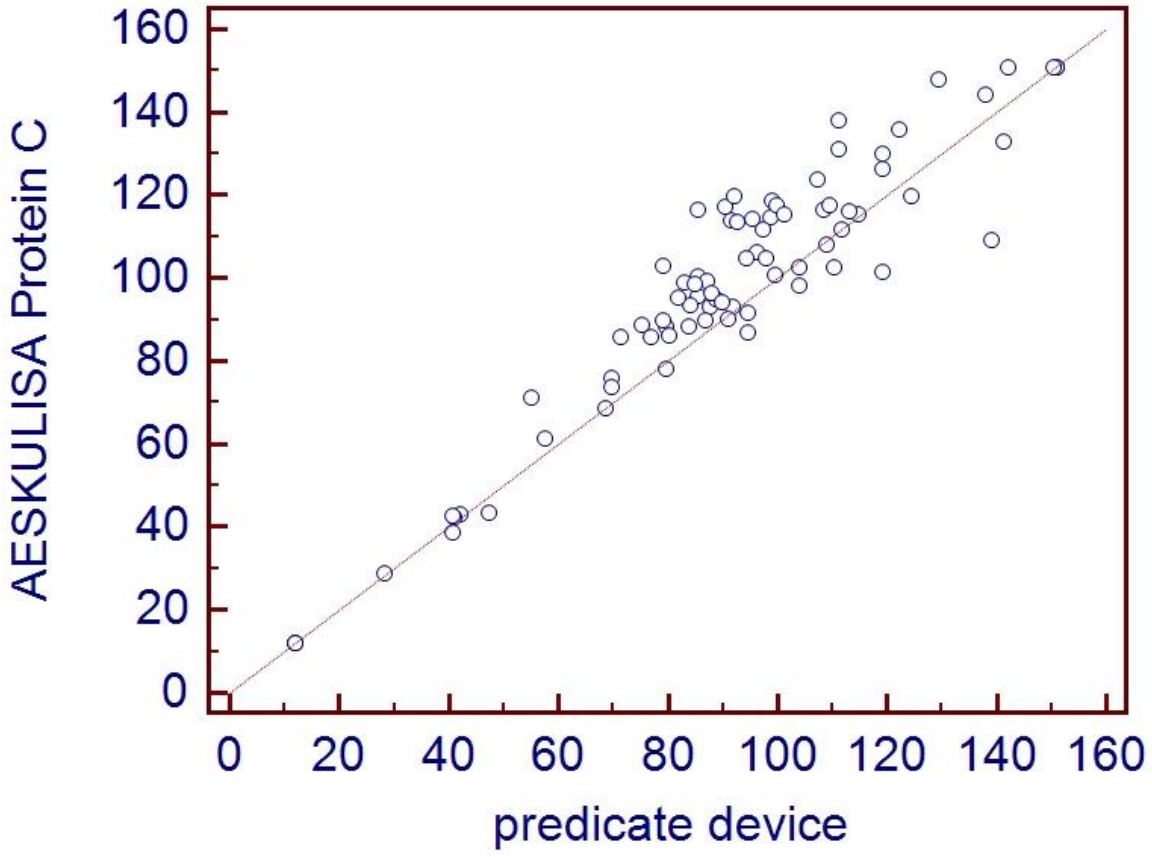
Οι πλάκες μικροτιτλοποίησης είναι επικαλυμμένες με ένα αντίσωμα καθήλωσης ειδικό για την ανθρώπινη πρωτεΐνη C. Σε συμφωνία με τις συστάσεις των διαγνωστικών εργαστηρίων, ένα δείγμα θεωρήθηκε ελλιπές στον αναλύτη εάν η μέτρηση ήταν κάτω από το 70% της κανονικής τιμής (Labor und Diagnose, εκδόσεις L. Thomas, 8η έκδοση 2012, Φρανκφούρτη/Μάιν, Γερμανία).

79 δείγματα πλάσματος ελέγχθηκαν με τη μέθοδο AESKULISA Protein C και μια συσκευή ανάλυσης επιβεβαίωσης.

	Συσκευή ανάλυσης επιβεβαίωσης			
AESKULISA Protein C		ΘΕΤ.	APN.	Σύνολο
	ΘΕΤ.	11	0	11
	APN.	3	65	68
	Σύνολο	14	65	79

Συνολικό ποσοστό συμφωνίας αποτελεσμάτων	96,2%	89,4% έως 98,7%
Ποσοστό συμφωνίας θετικών αποτελεσμάτων	78,6%	52,4% έως 92,4%
Ποσοστό συμφωνίας αρνητικών αποτελεσμάτων	100%	94,4% έως 100%

Ο συσχετισμός μεταξύ της μεθόδου AESKULISA Protein C και της συσκευής ανάλυσης επιβεβαίωσης είχε ως αποτέλεσμα έναν συντελεστή συσχέτισης r=0,945.



10.3 Γραμμικότητα

Τα επιλεγμένα δείγματα πλάσματος έχουν δοκιμαστεί με αυτό το κιτ και βρέθηκε η γραμμική συμπεριφορά της αραίωσης.

Αριθμ. Δείγματος	Αραίωση	μετρημένη συγκέντρωση (%)	αναμενόμενη συγκέντρωση (%)	Ανάκτηση (%)
1	1 / 50	115,30	120	96,1
	1 / 100	60,88	60	101,5
	1 / 200	31,71	30	105,7
	1 / 400	14,41	15	96,1
2	1 / 50	41,47	40	103,7
	1 / 100	19,86	20	99,3
	1 / 200	9,48	10	94,8
	1 / 400	4,85	5	97,0

10.4 Ακρίβεια

Για έλεγχο της ακρίβειας της μεθόδου, αξιολογήθηκε η διακύμανση (στην ίδια μέθοδο) με εξέταση της αναπαραγωγισιμότητας σε τρία δείγματα πλάσματος που επιλέχθηκαν ώστε να αντιπροσωπεύουν μια περιοχή άνω της πρότυπης καμπύλης.

Εσωτερική μέθοδος		
Αριθμ. δείγματος	**Μέσος όρος (%)**	**CV (%)**
1	115,0	5,3
2	93,0	1,7
3	27,0	2,1

Ενδιάμεση μέθοδος		
Αριθμ. δείγματος	**Μέσος όρος (%)**	**CV (%)**
1	116,2	2,4
2	43,3	7,4
3	8,1	3,7

10.5 Διακρίβωση

Η ποσοτική μέθοδος βαθμονομείται έναντι του δεύτερου διεθνούς προτύπου του WHO για την πρωτεΐνη C. Οι τιμές δίνονται σε σχετικό ποσοστό (%) σε σύγκριση με τη συγκέντρωση φυσιολογικού πλάσματος.

11 Βιβλιογραφία

Dahlbäck B, Villoutreix BO (2005). The anticoagulant Protein C pathway. FEBS Letters 579: 3310-3316.

Esmon CT (2003). The Protein C Pathway. Chest 124: 26-32.

Miletich JP (1990). Laboratory diagnosis of Protein C deficiency. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 16: 169-176.

Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA (1993). Anticoagulant Protein C Pathway defective in majority of thrombophilic patients. Blood 82: 1989-1993.

Preissner KT (1990). Biological relevance of the Protein C system and laboratory diagnosis of Protein C and S deficiencies. Clinical Science 17: 351-364.

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	
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	
i	¨ Rispettare le istruzioni per l'uso	¨ See instructions for use
	¨ Voir les instructions d'utilisation	¨ Ver las instrucciones de uso
	¨ Gebrauchsanweisung beachten	¨ Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	¨ Ver as instrucões de uso	
	¨ 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	¨ Store at 2-8°C (35-46°F)
	¨ Conserver à 2-8°C	¨ Conservar a 2-8°C
	¨ Lagerung bei 2-8°C	¨ Φυλάσσεται στους 2-8°C
	¨ Conservar entre 2-8°C	
	¨ Prodotto da	¨ Manufactured by
	¨ Fabriqué par	¨ Fabricado por
	¨ Hergestellt von	¨ Κατασκευάζεται από
	¨ Fabricado por	
REF. PLASMA	¨ Plasma di riferimento	¨ Reference Plasma
	¨ Plasma de référence	¨ Plasma de Referencia
	¨ Referenzplasma	¨ πλάσμα αναφοράς
	¨ Plasma de referência	
CON D	¨ Controllo „D"	¨ Control "D"
	¨ Contrôle „D"	¨ Control „D"
	¨ Kontrolle „D"	¨ έλεγχος „D"
	¨ Controlo „D"	
CON N	¨ Controllo „N"	¨ Control "N"
	¨ Contrôle „N"	¨ Control „N"
	¨ Kontrolle „N"	¨ έλεγχος „N"
	¨ Controlo „N"	
PEG	¨ Soluzione di PEG	¨ PEG solution
	¨ Solution PEG	¨ Solución PEG
	¨ PEG Lösung	¨ Διάλυμα PEG
	¨ Solução PEG	
RC	¨ Recupero	¨ Recovery
	¨ Corrélation	¨ Recuperado
	¨ Wiederfindung	¨ Ανάκτηση
	¨ Recuperacão	
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	