

**ΕΝΔΕΛΞΙΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ**

PAKAUTO® είναι μια ποιοτική, στερεάς φάσης ενζυματική ανοσοδεσμευτική μέθοδος ανάλυσης (ELISA) για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων αιμοπεταλίων εκλουσμένων από τα αιμοπετάλια των ασθενών ή κυκλοφορούντων στο πλάσμα ή στον ορό των ασθενών.

Για *Εργαστηριακή Διαγνωστική Χρήση*.

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ**

Η αυτοάνοση θρομβοκυτταροπενική πορφύρα (ΑΙΤΡ) είναι μια από τις συνηθέστερες αιτίες της άνοσο-θρομβοκυτταροπενίας. Περίπου οι μισές από τις περιπτώσεις ΑΙΤΡ, συσχετίζονται με άλλες καταστάσεις όπως π.χ. λέμφωμα, συστηματικό ερυθματώδη λύκο (ΣΕΛ) και μόλυνση HIV. Οι υπόλοιπες περιπτώσεις θεωρούνται «ιδιοπαθείς». Με βάση κλινικές παρουσιάσεις, η ΑΙΤΡ μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο τύπους: η οξεία ΑΙΤΡ, μία διαταραχή της παιδικής ηλικίας που είναι συνήθως αυτο-περιοριζόμενο νόσημα, και η χρόνια ΑΙΤΡ που παρατηρείται σε ενήλικες και η οποία σπανίως υποχωρεί αυτόματα.

Τα περισσότερα σχετιζόμενα με ΑΙΤΡ αντισώματα, αναγνωρίζουν γλυκοπρωτεΐνες μεμβράνης αιμοπεταλίων, ειδικά GPIIb/IIIa, GPIb/IX, και GPIa/IIa.<sup>1,2</sup> Τα αντιδρώντα, με αυτούς τους στόχους, αντισώματα μπορούν συχνά να ανιχνευθούν στο πλάσμα ασθενών με ΑΙΤΡ,<sup>1,2,3,4,5</sup> αλλά είναι προτιμότερο να προσδιορίζονται οι συσχετιζόμενες με αιμοπετάλια ανοσοσφαιρίνες, για να επιβεβαιωθεί η αυτοαντιδραστικότητα. Πολλές εξετάσεις που αφορούν στον προσδιορισμό των συσχετιζόμενων με αιμοπετάλια ανοσοσφαιρινών, μειονεκτούν ως προς την ειδικότητα, στο ότι, συχνά εμφανίζουν θετικά αποτελέσματα στους ασθενείς με μη-άνοσους τύπους θρομβοκυτταροπενίας.<sup>2</sup>

Τα μικροβυθίσματα Στερεάς Φάσης PAKAUTO® ELISA περιέχουν μονοκλωνικά δεσμευμένες γλυκοπρωτεΐνες IIb/IIIa, Ib/IX, και Ia/IIa. Η εξέταση έχει σχεδιαστεί ώστε να ανιχνεύει γλυκοπρωτεΐνικοειδικά αυτοαντισώματα αιμοπεταλίων στον ορό ή στο πλάσμα ασθενών, ή εκλουσμένα από την επιφάνεια των αιμοπεταλίων τους.

**ΑΡΧΗ**

Ορός, πλάσμα, ή έκλουσμα του ασθενούς, προστίθεται στα επιστρωμένα με γλυκοπρωτεΐνες αιμοπεταλίων μικροβυθίσματα, επιτρέποντας στο αντίσωμα, εάν υπάρχει, να δεσμευτεί. Κατόπιν, τα μη δεσμευμένα αντισώματα εκπλένονται. Αντιδραστήριο αλκαλικής φωσφατάσης σημασμένης με αντιανθρώπινη αιμοσφαιρίνη (Αντι-IgG/A/M) προστίθεται στα βυθίσματα και επωάζεται. Το μη δεσμευμένο Αντι-IgG/A/M εκπλένεται και προστίθεται το υπόστρωμα PNPP (p-νιτροφενυλική φωσφατάση). Μετά από περίοδο επώασης 30 λεπτών, η αντίδραση διακόπτεται με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Η οπτική πυκνότητα της αποκτώμενης χρώσης μετράται με φασματοφωτόμετρο.

**ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

Ανώτατος αριθμός αναλύσεων ανά διαγνωστικό σύνολο: 5

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται όπως αναγράφεται στην ετικέτα.

- |            |   |
|------------|---|
| <b>MS</b>  | 1. Μικροβυθίσματα: Μικροβυθίσματα ταινιών επίπεδου πυθμένα στο οποίο γλυκοπρωτεΐνες αιμοπεταλίων και IIb/IIIa, Ib/IX, και Ia/IIa έχουν ακινητοποιηθεί. Οι ταινίες μικροβυθισμάτων εσωκλείονται σε επανασφραγιζόμενη θήκη αλουμινίου. Έτοιμα προς χρήση.   |
| <b>TCW</b> | 2. Συμπυκνωμένο (10x) Πλυστικό: Αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρι (υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο περιέχον χλωριούχο νάτριο και Tween 20. 1% νατραζίδιο. Αραιώστε με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό προ χρήσης. Αποθηκεύσατε το Πλυστικό Διάλυμα έως 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή έως και επτά μέρες σε θερμοκρασία 2-8°C. |
| <b>SD</b>  | 3. Δείγμα Διαλύτη: Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών περιέχον Βόιο αλβουμίνη και ορό μυός. 0.1% νατραζίδιο. Έτοιμο προς χρήση.  |
| <b>SB</b>  | 4. Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος: Αυτό το διάλυμα περιέχει διαιθανολαμίνη και χλωριούχο μαγνήσιο. 0.02% νατραζίδιο. Έτοιμο προς χρήση. Προστατέψατε από το Φως.   |
| <b>SS</b>  | 5. Διάλυμα Διακοπής Αντίδρασης: 3 M Υδροξείδιο του Νατρίου. Έτοιμο προς χρήση. Χρησιμοποιείστε με προσοχή.  |

- AH** 6. Σύζευγμα: Σύζευγμα Αλκαλικής φωσφατάσης αιγός με αντίσωμα ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης υψηλώς κεκαθαρισμένο (IgG/A/M). 0.1% νατραζίδιο. Αραιώστε στον Διαλύτη Δείγματος προ χρήσης.
- CRP** 7. Διάλυμα Ενωρήματος Κυττάρων και Συντηρητικών: Ρυθμιστικό Διάλυμα Φοσφορικών περιέχον EDTA. 0.1% νατραζίδιο. Έτοιμο προς χρήση.
- BS** 8. Ρυθμιστικό Διάλυμα: Διάλυμα Tris περιέχον Βόιο αλβουμίνη. 0.1% νατραζίδιο.
- ES** 9. Διάλυμα Εκλούσματος: ένα χαμηλού pH ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης.
- PN** 10. Υπόστρωμα PNPP (p-νιτροφενυλική φωσφατάση): Κρυσταλλική σκόνη. Ανασυστήστε με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό και αραιώστε στο Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος προ χρήσης. Προστατέψατε από το Φως.
- PC** 11. Θετικός ορός Ελέγχου. Ανθρώπινος ορός. 0.1% νατραζίδιο. Αραιώστε στον Διαλύτη Δείγματος προ χρήσης.
- NC** 12. Αρνητικός ορός Ελέγχου. Ανθρώπινος ορός. 0.1% νατραζίδιο. Αραιώστε στον Διαλύτη Δείγματος προ χρήσης.
- PCP** 13. Θετικός Ορός ελέγχου Αιμοπεταλίων (Θετικός Ορός Έλέγχου Εκλούσματος): Αποξηραμένα σε κενό αέρος ανθρώπινα αιμοπετάλια επιστρωμένα με αντίσωμα. Ενυδατώστε εκ νέου, προ χρήσης με το Διάλυμα Ενωρήματος Κυττάρων και Συντηρητικών.
- NCP** 14. Φυσιολογικός Ορός Ελέγχου Αιμοπεταλίων (Αρνητικός Ορός Έλέγχου Εκλούσματος): Σύνολο ανθρώπινων αιμοπεταλίων αποξηραμένων εν κενώ αέρος. Ενυδατώστε εκ νέου, προ χρήσης, με Διάλυμα Ενωρήματος Κυττάρων και Συντηρητικών.
- PS** 15. Μembrάνες κάλυψης πλακών.

## **ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ**

- Μην χρησιμοποιείτε μολυσμένα ή θολά αντιδραστήρια.
- ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ προσοχή προς αποφυγή μόλυνσης του Διαλύτη Δείγματος και του Συζεύγματος. Η εξ' αμελείας μόλυνση αυτών των αντιδραστηρίων με ανθρώπινο ορό ή πλάσμα θα έχει ως αποτέλεσμα την ουδετεροποίηση του Συζεύγματος και ως εκ τούτου, την αποτυχία της ανάλυσης.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια πέραν της αναγραφόμενης ημ/ίας λήξης.
- Τα, περιεχόμενα στο διαγνωστικό σύνολο, μικροβυθίσματα και αντιδραστήρια δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται με άλλο σύστημα ανάλυσης.
- Υποκατάσταση των συστατικών με άλλα, από τα παρεχόμενα σε αυτό το διαγνωστικό σύνολο, μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
- Απορρίψατε όποιες ποσότητες αραιωμένου Συζεύγματος, αραιωμένου Θετικού και Αρνητικού Ορού Ελέγχου, και αραιωμένου ή ανασυσταμένου αντιδραστηρίου PNPP μετά από κάθε ανάλυση.
- Κατά τις αραιώσεις, ακολουθείστε τις οδηγίες του κατασκευαστή των διανεμητών για τις τεχνικές διανομής και έκπλυσης.
- Η κατά την τελευταία επώαση, αντίδραση ενζυματικού υποστρώματος, είναι ευαίσθητη στην θερμοκρασία και πρέπει να διενεργείται σε ελεγχόμενη περιοχή, σε θερμοκρασία 22-25°C.
- Εξ' αιτίας μεταβολών στα όργανα ή υψηλότερων ή χαμηλότερων θερμοκρασιών δωματίου, συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθιερώνει συγκεκριμένο χρόνο επώασης, ελάχιστα μεγαλύτερο ή μικρότερο, προκειμένου να έχει συνεπή και αξιόπιστα αποτελέσματα των ορών ελέγχου. Επειδή η θερμοκρασία της τελευταίας επώασης ενδέχεται να επηρεάσει τις τιμές των ορών ελέγχου, είναι σημαντικό να ελέγχεται περιοδικά η, σε θερμοκρασία δωματίου, διαδικασία της επώασης.

## **ΠΡΟΣΟΧΗ**

- Όλοι οι χρησιμοποιούμενοι στους Θετικούς και Αρνητικούς Ορούς Ελέγχου για αυτό το προϊόν ανθρώπινοι οροί, έχουν εξεταστεί και βρεθεί αρνητικοί για αντισώματα κατά HIV, HCV και HbsAg από τις εγκεκριμένες μεθόδους του FDA. Ωστόσο, καμία μέθοδος ελέγχου δεν μπορεί να εγγυηθεί απόλυτα την απουσία του ιού HIV, Ηπατίτιδας C, Ηπατίτιδας B, ή άλλων μολυσματικών παραγόντων. Ως εκ τούτου ο χειρισμός αυτών των υλικών συνιστάται να είναι τέτοιος ως εάν να επρόκειτο για εν δυνάμει μολυσματικό υλικό.
- Κάποια από τα παρεχόμενα σε αυτό το διαγνωστικό σύνολο αντιδραστήρια περιέχουν νατραζίδιο ως συντηρητικό.

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Το νατραζίδιο αντιδρά με τον χαλκό και τον μόλυβδο των υδραυλικών σωληνώσεων και σχηματίζει εκρηκτικά μεταλλικά αζίδια. Όταν απορρίπτετε το αντιδραστήριο, περιχύστε το με άφθονο νερό ούτως ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός αζιδίων. Το νατραζίδιο είναι δηλητήριο και τοξικό αν έρθει σε επαφή με το δέρμα ή απορροφηθεί από τις βλεννογόνους μεμβράνες.

- Το διάλυμα διακοπής της αντίδρασης (NaOH) είναι διαβρωτικό. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Τυχούσα πτώση του διαλύματος πρέπει να καθαρίζεται αμέσως.
- Απορρίψατε όλα τα συστατικά όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση σύμφωνα με τους, κατά τόπους, κανονισμούς.

## **ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Το αίμα θα πρέπει να συλλέγεται σε EDTA (πλάσμα, αιμοπετάλια) ή χωρίς αντιπηκτικό (ορός) χρησιμοποιώντας ασηπτική τεχνική και θα πρέπει να εξετάζεται ενώ είναι ακόμη φρέσκο, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα να πάρουμε ψευδώς θετικές ή ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις, εξ' αιτίας ακατάλληλης αποθήκευσης ή μόλυνσης του δείγματος. Δείγματα ορού ή πλάσματος που δεν μπορούν να εξεταστούν άμεσα θα πρέπει να φυλάσσονται στους 2 έως 8°C έως 48 ώρες αλλιώς να καταψύχονται.

Τα δείγματα που καταψύχονται σε θερμοκρασία -20°C ή χαμηλότερη, παραμένουν σε καλή κατάσταση για αρκετό καιρό (2-3 χρόνια). Ωστόσο, προκειμένου να αποφευχθούν οι καταστροφικές επιπτώσεις της επαναλαμβανόμενης κατάψυξης-απόψυξης, συνιστάται η τοποθέτηση των δειγμάτων σε ειδικά φιαλίδια κατάψυξης και η αποθήκευσή τους σε μικρές ποσότητες στην κατάψυξη. Αποφύγετε την χρήση καταψυκτών χωρίς πάγο.

Ο ορός ή το πλάσμα θα πρέπει να διαχωρίζεται από τα ερυθρά κύτταρα όταν αποθηκεύεται ή αποστέλλεται.

Σωματίδια ή συσσωματώματα στο δείγμα ενδέχεται να προκαλέσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα ή λανθασμένες τιμές στις επαναληπτικές εξετάσεις. Τα περιέχοντα σωματίδια δείγματα πρέπει να καθαρίζονται με φυγοκέντρηση προ της ανάλυσης.

Αποφύγετε την χρήση μικροβιακά μολυσμένων, λιπαιμικών, ικτερικών, ή αδρανοποιημένων με θέρμανση δειγμάτων, διότι μπορεί να προκύψουν μη συνεπή αποτελέσματα.

Για την προετοιμασία εκλουσμάτων αιμοπεταλίων, απαιτείται ελάχιστη ποσότητα  $1 \times 10^7$  αιμοπεταλίων. (προτιμώνται αιμοπετάλια  $5 \times 10^7$ ). Αρκετό δείγμα μπορεί να συλλεχθεί από ασθενείς με μετρήσεις αιμοπεταλίων  $\geq 10,000/\mu\text{L}$  συλλέγοντας δύο φιαλίδια ολικού αίματος των 7mL.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Η αποστολή των δειγμάτων με πλοίο, μπορεί να επιφέρει μείωση αιμοπεταλίων. Όταν πρόκειται να μεταφερθούν δείγματα, προτιμάται η συλλογή μεγαλύτερου δείγματος για να διασφαλιστεί η επάρκεια αιμοπεταλίων προς έκλουση.

## **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

### **Παρεχόμενα Υλικά:**

Τα φιαλίδια ενδεχομένως να περιέχουν περισσότερο αντιδραστήριο από το περιγραφόμενο στις ετικέτες. Βεβαιωθείτε ότι μετράτε το αντιδραστήριο με μια κατάλληλη συσκευή κατά την αραιώση.

1. 6 – 2 x 8 Ταινίες Μικροβυθισμάτων με βάση στήριξης
2. 1 x 50 mL Συμπυκνωμένο Πλυστικό
3. 1 x 14 mL Διαλύτης Δείγματος
4. 1 x 14 mL Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος
5. 1 x 14 mL Διάλυμα Διακοπής Αντίδρασης
6. 1 x 80  $\mu\text{L}$  Σύζευγμα Αντιανθρώπινης IgG/A/M
7. 1 x 50 mL Διάλυμα Εναιωρήματος και Συντήρησης Κυττάρων
8. 1 x 2.5 mL Ρυθμιστικό Διάλυμα
9. 1 x 2.5 mL Διάλυμα Εκλούσματος
10. 3 x 50 mg PNPP Υπόστρωμα
11. 1 x 0.3 mL Θετικός ορός ελέγχου
12. 1 x 0.7 mL Αρνητικός ορός ελέγχου
13. 1 Θετικός Ορός Ελέγχου Αιμοπεταλίων (Θετικός Ορός Ελέγχου Εκλούσματος)
14. 1 Φυσιολογικός Ορός Ελέγχου Αιμοπεταλίων (Αρνητικός Ορός Ελέγχου Εκλούσματος)
15. 6 Ταινίες σφράγισης Πλακών

### **Πρόσθετα Απαιτούμενα Υλικά:**

1. Δοκιμαστικοί σωλήνες για τα δείγματα ασθενών και αραιώσεις ορών ελέγχου και αντιδραστηρίων
2. Πιπέττες μεταφοράς
3. Προσαρμοσμένες μικροπιπέττες διανομής 10 – 100  $\mu\text{L}$ , και 100 – 1,000  $\mu\text{L}$  και ρύγχη μιας χρήσης

4. Χρονόμετρο
5. Συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας ικανή να μετρά ΟΠ σε 405 ή 410 και 490 nm
6. Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
7. Απορροφητικές πετσέτες χαρτιού
8. Συσκευή πλύσης μικροπλάκας
9. Συσκευή φυγοκέντρισης για τον διαχωρισμό του ορού ή του πλάσματος των δειγμάτων των ασθενών
10. Συσκευή επώασης ή υδατόλουτρο 37°C
11. Φιαλίδια μικροφυγοκέντρισης
12. Μικροφυγοκέντριση αιμοπεταλίων
13. Φυσιολογικά αιμοπετάλια ( $5 \times 10^7$ ) για ορό ελέγχου εκλούσματος

#### Διαδικασία Ανάλυσης

1. Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Φτιάξτε το διάλυμα Πλυστικού, αραιώνοντας το. Προσθέστε 1 όγκο Συμπυκνωμένου Πλυστικού σε 9 Όγκους απιονισμένου ή αποσταγμένου νερού. Αναμείξτε καλά.
3. Προσδιορίστε τον αριθμό των προς εξέταση δειγμάτων, των ασθενών. Χρησιμοποιώντας το Φύλλο Καταγραφής, ορίστε κάθε δείγμα σε μια τοποθεσία αποτελούμενη από μια στήλη. Καταγράψτε την ταυτότητα κάθε δείγματος στο Φύλλο Καταγραφής.

#### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΟΡΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ

4. Αραιώστε ως ακολούθως και αναμείξτε καλά:

|                 | Όγκο Διαλύτη Δείγματος | Όγκο Δείγματος |
|-----------------|------------------------|----------------|
| PC              | 150 $\mu$ L            | 50 $\mu$ L     |
| NC              | 300 $\mu$ L            | 100 $\mu$ L    |
| Δείγμα Ασθενούς | 300 $\mu$ L            | 100 $\mu$ L    |

5. Προετοιμάστε τα αιμοπετάλια του ασθενούς ή του δότη ως ακολούθως:
  - a) Προετοιμάστε το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP) φυγοκεντρίζοντας τα δείγματα αίματος σε EDTA 110 – 150 rcf επί 10 - 15 λεπτά.
  - b) Μεταφέρετε το PRP σε ένα καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα πολυπροπυλενίου και φυγοκεντρίστε στα 10,600 rcf επί 5 – 10 λεπτά για να αποκτήσετε το ίζημα αιμοπεταλίων. Αφαιρέστε το πλάσμα.
  - c) Προσθέστε 500  $\mu$ L του CRP στα σφαιρίδια των αιμοπεταλίων και αναμείξτε ήπια με μια μικρή πιπέττα. Μεταφέρετε το αιώρημα των αιμοπεταλίων σε σωλήνα φυγοκέντρισης και πλύνετε τρεις φορές με τουλάχιστον με 500  $\mu$ L Διάλυμα Εναιωρήματος και Συντήρησης Κυττάρων.
  - d) Μετά την τελευταία πλύση, προετοιμάστε ένα ίζημα αιμοπεταλίων περιέχον μεταξύ 1 και  $5 \times 10^7$  αιμοπετάλια. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί κάνοντας ξανά εναιώρηση των αιμοπεταλίων με CRP προσαρμόζοντας τον αριθμό σε 10,000 – 50,000 αιμοπετάλια ανά  $\mu$ L. Μεταφέρετε 1 mL σε ένα σωλήνα φυγοκέντρισης και φυγοκεντρίστε επί 5 λεπτά στα 10,600 rcf ώστε να καθιζάνει. (Εναλλακτικά, ένα ίζημα αιμοπεταλίων 5-10  $\mu$ L θα πρέπει να περιέχει αρκετά αιμοπετάλια για την έκλυση. Συγκρίνετε το ίζημα των αιμοπεταλίων με αυτό ενός πανομοιότυπου σωλήνα, περιέχοντα 5-10  $\mu$ L Διαλύτη Δείγματος.)
6. Προετοιμάστε τον ορό ελέγχου του ιζήματος των αιμοπεταλίων:
  - a) Προσθέστε 500  $\mu$ L Διαλύματος Εναιωρήματος και Συντήρησης Κυττάρων στον Θετικό Ορό Ελέγχου Αιμοπεταλίων (Θετικός Ορός Ελέγχου Εκλούσματος), και εάν απαιτείται, τον Φυσιολογικό Ορό Ελέγχου Αιμοπεταλίων (Αρνητικός Ορός Ελέγχου Εκλούσματος). Αφήστε να σταθεί σε θερμοκρασία δωματίου επί τουλάχιστον 10 λεπτά προκειμένου να ενυδατωθεί εκ νέου. Αναμείξτε ήπια για να πάρετε το εναιώρημα και φυγοκεντρίστε στα 10,600 rcf επί 5-10 λεπτά. Αναρροφήστε το υπερκείμενο και αφυγράνετε το εναπομείναν ρυθμιστικό διάλυμα για να πάρετε την αφυγρασμένη μάζα αιμοπεταλίων .

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται φρέσκα φυσιολογικά αιμοπετάλια για τον Αρνητικό Ορό Ελέγχου Εκλούσματος, αλλά παρέχονται αιμοπετάλια σε αποξηραμένη μορφή, σε περίπτωση που δεν διατίθενται φυσιολογικά αιμοπετάλια.

7. Προετοιμάστε τα Εκλούσματα:

- a) Πριν προχωρήσετε, βεβαιωθείτε ότι τα αιμοπετάλια είναι ευκρινώς μορφοποιημένα σε ίζημα και όλο το εναπομείναν CRP έχει αφαιρεθεί.
- b) Προσθέστε 180  $\mu$ L Διαλύματος Εκλούσματος σε κάθε κουμπί αιμοπεταλίων και αναμείξτε με μια πιπέττα. Αφήστε το μείγμα να σταθεί σε θερμοκρασία δωματίου επί 2 λεπτά. Φυγοκεντρίστε στα 10,600 rcf επί 5-10 λεπτά σε συσκευή φυγοκέντρισης.

c) Μεταφέρετε αμέσως τα επιπλέοντα (εκλούσματα) σε έναν καθαρό σωλήνα φυγοκέντρισης και προσθέστε 180  $\mu\text{L}$  Ρυθμιστικού Διαλύματος σε κάθε σωλήνα. Αναμειξάτε πολύ καλά. Βάλτε το σε σωλήνα φυγοκέντρισης στην συσκευή φυγοκέντρισης στα 10,600 rcf επί 10 λεπτά για να αφαιρεθούν όποια υπόλοιπα.

8. Εξετάστε αμέσως ή καταψύξτε για μελλοντική εξέταση. Τα εκλούσματα αιμοπεταλίων μπορούν να αποθηκευτούν καταψυγμένα στους  $-80^\circ\text{C}$  για μελλοντική χρήση.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Μην αραιώνετε τα εκλούσματα.

9. Αφαιρέστε το πλαίσιο με τα μικροβυθίσματα από τη θήκη. Αμέσως αφαιρέστε και επανασφραγίστε τις ταινίες που δεν χρειάζονται, στην προστατευτική θήκη.

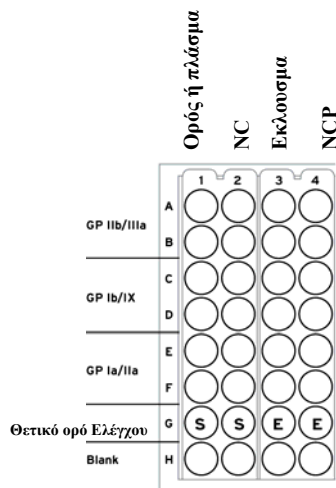
ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Παρέχεται μόνο ένα πλαίσιο στο διαγνωστικό σύνολο. Μην το πετάξετε έως ότου χρησιμοποιηθούν όλες οι ταινίες.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Προσανατολίστε τα βοθρία με το A1 στην άνω αριστερή γωνία. Βεβαιωθείτε πως όλα τα βοθρία είναι σωστά τοποθετημένα και βαθιά στις εγκοπές τους. Αριθμείστε κάθε σειρά για να αποφύγετε λάθη. Διατηρείστε την ίδια κατεύθυνση στην μικροπλάκα σε όλη την διάρκεια της εξέτασης.

10. Προσθέστε 300  $\mu\text{L}$  του Πλυστικού διαλύματος στα προκαθορισμένα βυθίσματα. και αφήστε τα σε θερμοκρασία δωματίου επί 5-10 λεπτά.

11. Αναρροφείστε το υγρό δυνατά και αναποδογυρίστε σε απορροφητικό χαρτί προς αποφυγή αφύγρανσης.

12. Προσθέστε 50  $\mu\text{L}$  του κατάλληλου εκλούσματος ή του αραιωμένου ορού ελέγχου ή του δείγματος στα βυθίσματα, της στήλης που περιγράφεται στο σχήμα 1.



σχήμα 1

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Μην προσθέτετε δείγματα ή αντιδραστήρια σε τυφλά βυθίσματα.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Εάν εξετάζονται πολλαπλά δείγματα ασθενών ταυτόχρονα, απαιτείται μόνο ένα σετ ορών ελέγχου. ΒΑΛΤΕ ΕΤΙΚΕΤΕΣ ΣΕ ΚΑΘΕ ΤΑΙΝΙΑ ΠΡΟΣ ΑΠΟΦΥΓΗ ΛΑΘΩΝ.

13. Σφραγίστε τα μικροβυθίσματα με ταινία κάλυψης πλακών και επώαστε για 30-35 λεπτά σε υδατόλουτρο  $37^\circ\text{C}$ . Εάν χρησιμοποιηθεί ξηρό επωαστικό, αυξήσατε τον χρόνο επώασης κατά 10 λεπτά.

14. Αραιώστε το Σύζευγμα με τον Διαλύτη Δείγματος με αναλογία 1 προς 100. Χρησιμοποιείστε το δοχείο πολυπροπυλενίου.

|          |                  |                  |
|----------|------------------|------------------|
| Ταινίες: | 2 – 2 x 8        | 6 – 2 x 8        |
| AH       | 20 $\mu\text{L}$ | 60 $\mu\text{L}$ |
| SD       | 2.0 mL           | 6.0 mL           |

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Το Σύζευγμα είναι ιξώδες. Εμβραπτίστε το ρύγχος στο Σύζευγμα πριν την διανομή και ξεβγάλατε μετά την πρόσθεση στον Διαλύτη Δείγματος. Ανακατέψτε καλά.

15. ΠΛΥΣΙΜΟ:

- Αναρροφήσατε τα περιεχόμενα κάθε βυθίσματος και αφυγράνετε σε απορροφητικό χαρτί.
- Προσθέστε 300  $\mu\text{L}$ , Πλυστικού Διαλύματος.
- Αναρροφήσατε ή αφαιρέστε το υγρό.
- Επαναλάβετε τα βήματα b + c επί συνολικά 3 ή 4 πλυσίματα.
- Αφαιρέστε απότομα το υγρό για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα του πλυστικού διαλύματος. Αναστρέψατε σε απορροφητικό χαρτί για να εμποδίσετε την αφύγρανση.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Είναι σημαντικό να αφαιρέσετε τελείως όλο το πλυστικό διάλυμα μετά την τελευταία πλύση.

- Προσθέσατε 50  $\mu\text{L}$  αραιωμένου Συζεύγματος (όπως αυτή έγινε σε προηγούμενο στάδιο) σε όλα τα βυθίσματα ΕΚΤΟΣ από αυτά που έχουν χαρακτηριστεί ως ΤΥΦΛΑ.
- Σφραγίστε τα μικροβυθίσματα με ταινία σφράγισης πλάκας και επώαστε επί 30-35 λεπτά σε υδατόλουτρο 37°C. Αν χρησιμοποιείται ξηρό επωαστήριο, αυξήστε τον χρόνο κατά 10 λεπτά.
- Αραιώστε το Υπόστρωμα PNPP προσθέτοντας 0.5 mL αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό στο φιαλίδιο. Επανατοποθετείστε το Διάλυμα Διακοπής της Αντίδρασης (stopper), και ανακατέψτε καλά. Προστατέψτε από το φως, έως την χρήση.
- Αραιώστε το PNPP με το Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος σε αναλογία 1 προς 100.

|          |                  |                   |
|----------|------------------|-------------------|
| Ταινίες: | 2 – 2 x 8        | 6 – 2 x 8         |
| PN       | 40 $\mu\text{L}$ | 120 $\mu\text{L}$ |
| SB       | 4.0 mL           | 12.0 mL           |

Αναμείξτε καλά. Προστατέψτε από το φως, έως την χρήση.

20. ΠΛΥΣΙΜΟ:

- Αναρροφήσατε τα περιεχόμενα κάθε βυθίσματος και αφυγράνετε σε απορροφητικό χαρτί.
- Προσθέστε 300  $\mu\text{L}$ , Πλυστικού Διαλύματος.
- Αναρροφήσατε ή αφαιρέστε το υγρό.
- Επαναλάβετε τα βήματα b + c επί συνολικά 3 ή 4 πλυσίματα.
- Αφαιρέστε απότομα το υγρό για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα του πλυστικού διαλύματος. Αναστρέψατε σε απορροφητικό χαρτί για να εμποδίσετε την αφύγρανση.

Προχωρήστε άμεσα στα επόμενα τρία στάδια.

- Προσθέτετε 100  $\mu\text{L}$  του αραιωμένου διαλύματος PNPP σε όλα τα βυθίσματα ΕΚΤΟΣ αυτών που έχουν χαρακτηριστεί ως ΤΥΦΛΑ.
- Αφήστε τα μικροβυθίσματα να σταθούν στο σκοτάδι επί 30 λεπτά σε ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ (22-25°C).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Ο χρόνος επώασης και η θερμοκρασία μετά την πρόσθεση του PNPP είναι κρίσιμα. ΜΗΝ τροποποιήσετε τους προκαθορισμένους χρόνους επώασης και την θερμοκρασία. Για λόγους διατήρησης σταθερότητας, ξεκινήστε την χρονομέτρηση αμέσως μετά την πρόσθεση του αντιδραστηρίου στο πρώτο βύθισμα.

- Διακόνετε την αντίδραση προσθέτοντας 100  $\mu\text{L}$  Διαλύματος Διακοπής της Αντίδρασης σε κάθε βύθισμα με την ίδια σειρά με την οποία προσετέθη το υπόστρωμα. Προσθέστε 200  $\mu\text{L}$  Διαλύματος Διακοπής της Αντίδρασης στα τυφλά βυθίσματα.
- Διαβάστε την απορρόφηση (ΟΠ) κάθε βυθίσματος στα 405 ή 410 nm χρησιμοποιώντας φίλτρο αναφοράς 490 nm. Εάν τα αποτελέσματα δεν μπορούν να διαβαστούν αμέσως επιστρέψτε τα βυθίσματα σε σκοτεινό μέρος και αφήστε τα να μείνουν έως και 30 λεπτά.
- Αφαιρέστε τις αποκτηθείσες τιμές από τα τυφλά βυθίσματα από όλα τα βυθίσματα δειγμάτων και ορών ελέγχου. Πολλές συσκευές ELISA είναι προγραμματισμένες να διεκπεραιώνουν αυτό το στάδιο αυτόματα.
- Καταγράψτε τα αποτελέσματα στο Φύλλο Καταγραφής Αποτελεσμάτων.

## **ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ**

Ο ποιοτικός έλεγχος του ΡΑΚΑΥΤΟ® είναι ενσωματωμένος στο σύστημα ανάλυσης με την συμπερίληψη των Αρνητικού και Θετικού Ορών Ελέγχου. Αυτοί οι οροί ελέγχου πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε κάθε τεστ εξέταση προκειμένου να προσδιορίζονται τυχόντα τεχνικά λάθη και λάθη αντιδραστηρίων.

Κριτήρια αξιοπιστίας εξέτασης:

|          | Αρνητικό ορό Ελέγχου     | Θετικό ορό Ελέγχου |
|----------|--------------------------|--------------------|
| Εκλουσμα | ≤ 0.100 (IIb/IIIa σειρά) | ≥ 1.000            |
| Ορός     | ≤ 0.160 (IIb/IIIa σειρά) | ≥ 1.000            |

Οι αποκτηθείσες, από διπλές αναλύσεις, τιμές ΟΠ θα πρέπει να εμπίπτουν μέσα στο 20% του μέσου όρου των δύο τιμών. Τα δείγματα, των οποίων τα αποτελέσματα βρίσκονται έξω από αυτό το όριο, πρέπει να επανεξετασθούν.

**ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ:** Η κακή επαναληψιμότητα των διπλών μπορεί να είναι αποτέλεσμα παράλειψης του αντιδραστηρίου ή του δείγματος, άνιση πρόσθεση αντιδραστηρίων, άνισες θερμοκρασίες κατά την επώαση, απ' ευθείας έκθεση στο φως κατά την τελευταία επώαση ή διασταυρούμενη επιμόλυνση. Η αποτυχία να γίνει η εξέταση εις διπλούν, ενδεχομένως να οδηγήσει στην αποδοχή λανθασμένων αποτελεσμάτων.

## **ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Αποτελέσματα που δείχνουν τιμές Οπτικής Πυκνότητας (OD) ίσες ή μεγαλύτερες από 2X την αποκτηθείσα τιμή του μέσου όρου των αρνητικών ορών ελέγχου των αντιστοιχούντων γλυκοπρωτεϊνών (2 τιμές αρνητικού ορού για κάθε γλυκοπρωτεΐνη) θεωρούνται θετικά αποτελέσματα.

## **ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ**

Τα λανθασμένα αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από βακτηριακή μόλυνση των υλικών της εξέτασης, ανεπαρκείς χρόνους επώασης, ανεπαρκείς ή πλημμελείς πλύσεις των υπό εξέταση βυθισμάτων, έκθεση του υποστρώματος σε απ' ευθείας φως, έκθεση σε υψηλότερες ή χαμηλότερες από τις συνιστώμενες θερμοκρασίες, ανεπαρκή ή υπερβολικά αιμοπετάλια, ή παράλειψη κάποιου σταδίου. Η παρουσία ανοσοσυμπλεγμάτων ή συσσωματωμάτων ανοσοσφαιρίνης στο δείγμα του ασθενούς, ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένη μη-ειδική δέσμευση και να παράξει ψευδώς θετικά στην ανάλυση.

Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως η μόνη βάση μιας κλινικής απόφασης.

Κάποιοι χαμηλοί τίτλοι, χαμηλής ζωτικότητας αντισώματα μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμα με την χρήση αυτής της ανάλυσης.

Αυτό το προϊόν είναι ειδικά σχεδιασμένο να ανιχνεύει αυτοαντισώματα τα οποία έχουν εκλουσθεί από τα αιμοπετάλια ασθενών. Ως εκ τούτου, μια αποκτώμενη, από μόνο τον ορό ή το πλάσμα του ασθενούς, θετική αντίδραση, δεν αποτελεί απαραίτητα ένδειξη παρουσίας αυτοαντισώματος. Τα ειδικά αλλοαντισώματα έναντι αιμοπεταλίων μπορεί επίσης να αντιδρούν, με την χρήση αυτής της εξέτασης.

Το ΡΑΚΑΥΤΟ® έχει σχεδιαστεί να ανιχνεύει αυτοαντισώματα αντιδρώντα με τις γλυκο -πρωτεΐνες αιμοπεταλίων IIb/IIIa, Ib/IX, και Ia/IIa. Τα αυτοαντισώματα κατά άλλων πρωτεϊνών αιμοπεταλίων δεν αναμένεται να αντιδράσουν, σε αυτή την εξέταση.

Σε αυτή την ανάλυση, ένα αυτοαντίσωμα, είναι πιθανό να δώσει ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα, διότι εμποδίζεται από τα μυϊκά μονοκλωνικά αυτοαντισώματα, τα οποία χρησιμοποιούνται για να αιχμαλωτίσουν γλυκοπρωτεΐνες αιμοπεταλίων.

## **ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΛΟΣΗΣ**

Όταν αποθηκεύεται και χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις ως άνω οδηγίες, αυτό το προϊόν μπορεί να ανιχνεύσει αυτοαντισώματα κατά γλυκοπρωτεϊνών αιμοπεταλίων.

Προκειμένου να διασφαλιστεί η κατάλληλη αντιδραστικότητα και ειδικότητα, κάθε παρτίδα ΡΑΚΑΥΤΟ® εξετάζεται πριν κυκλοφορήσει με δείγματα περιέχοντα αυτοαντισώματα ή αλλοαντισώματα αντιδρώντα με τις γλυκοπρωτεΐνες τις περιγραφόμενες στο Φύλλο Καταγραφής Καθώς και δείγματα για τα οποία ξέρουμε ότι είναι ελεύθερα τέτοιων αντισωμάτων.

## Αξιολόγηση Απόδοσης

Συγκριτική μέθοδος

| ΠΑΚΑΥΤΟ® |          | Συγκριτική μέθοδος |          | Σύνολο |
|----------|----------|--------------------|----------|--------|
|          |          | Θετικό             | Αρνητικό |        |
|          | Θετικό   | 24                 | 1        | 25     |
|          | Αρνητικό | 23                 | 49       | 72     |
|          | Σύνολο   | 47                 | 50       | 97     |

Συμφωνία: 75.3%

Συν-θετικότητα: 51.1% Συν-αρνητικότητα: 98%

Συγκριτική μέθοδος: IgG\* Συσχετιζόμενη με αιμοπετάλια (Κυτταρομετρία Ροής)  
\*PAIgG αυτή η τεχνική έχει χαμηλή θετική προγνωστική αξία (για ITP <sup>6,7</sup>)

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. George JN, El-Harake MA, Raskob GE: N. Engl J. Med 331:1207, 1994.
2. George JN, El-Harake MA, Aster RH: Thrombocytopenia due to enhanced platelet destruction by immunologic mechanisms. In Williams Hematology, E Boytler, et al., eds, 5<sup>th</sup> ed, McGraw-Hill, 1995, p 1315.
3. Bussel JP, Schreiber AD: Immune thrombocytopenic purpura. In Hematology: Basic Principles and Practice, R. Hoffman, et al., eds, Churchill Livingstone, Inc., New York, 1991, p 1485.
4. McMillan R, Imback PA: Immune thrombocytopenic purpura. In Thrombosis and Hemorrhage, J. Loscalzo and Al Schafer, eds, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994, p 575.
5. Aster RH: The immunologic thrombocytopenias. In Platelet Immunology, TJ Kunicki, JN George, eds, Lipincott, Philadelphia, 1989, p 387.
6. Kelton JG, Powers PJ, Carter CJ: A Prospective Study of the Usefulness of the Measurement of Platelet-Associated IgG for the Diagnosis of Idiopathic Thrombocytopenia Purpura. Blood 1982; 60 No.4: 1050.
7. McMillan R, et.al. Platelet associated and Plasma Anti-Glycoprotein Autoantibodies in Chronic ITP. Blood, 1987; 70 No.4: 1040.

U.S. Patent #5,514,557



ΠΑΚΑΥΤΟ®

- ΓΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
- ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΕ 2-8°C

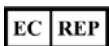
**GTi DIAGNOSTICS®**

Good science starts with people.®

20925 Crossroads Circle, Suite 200  
Waukesha, WI 53186-4054 USA  
(262) 754-1000 ή 1-800-233-1843

REF ΠΑΚΑΥΤΟ

Αναθεωρήθηκε 2007-08-08 (Gr)



Qarad b.v.b.a.  
Volmolenheide 13  
B-2400 Mol  
Belgium



[www.gtidiagnostics.com](http://www.gtidiagnostics.com)