



Ανοσοενζυμική εξέταση για τον ποσοτικό προσδιορισμό του διαλυτού υποδοχέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (suPAR) στο ανθρώπινο πλάσμα και στον ορό.

Κωδικός αρ. E001 suPARnostic® AUTO Flex ELISA

Για άλλες γλώσσες επισκεφθείτε τον ιστότοπό μας: <http://www.virogates.com/>

Αυτό το προϊόν προστατεύεται από ένα ή περισσότερα διπλώματα ευρεσιτεχνίας καταχωρημένα στις ΗΠΑ, την Ευρώπη ή/και άλλες χώρες.

Υποστηρίζοντας την Διαλογή των Ασθενών (Triage)

Παρακαλώ ελέγξτε το www.virogates.com για τις πιο πρόσφατες ενημερώσεις για όλα τα προϊόντα suPARnostic®, οδηγίες εξετάσεων καθώς και άλλα εργαλεία.



ViroGates A / S
Banevænget 13

DK-3460 Birkerød Δανία

Τηλέφωνο: +45 2113 1336

E-mail: info@virogates.com www.virogates.com

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ	3
Ο SUPAR ΕΙΝΑΙ ΔΕΙΚΤΗΣ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	3
ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	3
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	4
ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ.....	5
ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ.....	5
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ-ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΕΙΡΩΝ ΠΗΓΑΔΙΩΝ (ΜΟΝΑ).....	5
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ–ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΕΙΡΩΝ ΠΗΓΑΔΙΩΝ (ΜΟΝΑ)	9
ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	10
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ	11
LOB, LOD, LOQ.....	11
Φαινόμενο «αγκίστρου» (Hook effect).....	12
ΔΙΑΧΕΙΡΗΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ	12
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	12

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Για διαγνωστική χρήση In Vitro.

Η suPARnostic® AUTO Flex ELISA χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του διαλυτού ενεργοποιητή του υποδοχέα του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (suPAR) στο ανθρώπινο πλάσμα και στον ορό.

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται λαμβάνοντας υπόψη το κλινικό ιστορικό του ασθενούς και τα αποτελέσματα άλλων διαγνωστικών εξετάσεων εάν είναι διαθέσιμα.

Η suPARnostic® AUTO Flex ELISA με 8 x 12 διασπώμενα πηγάδια επιτρέπει ευελιξία στον αριθμό των δειγμάτων προς ανάλυση (έως 91 μονά δείγματα) και μια /ή πολλαπλές δοκιμασίες που μπορούν να εκτελεστούν από ένα μόνο σύνολο αντιδραστηρίων.

Ο SUPAR ΕΙΝΑΙ ΔΕΙΚΤΗΣ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Ο suPAR είναι η διαλυτή μορφή του υποδοχέα ουροκινάσης (uPAR). Η ποσότητα του suPAR είναι μέτρο ανοσολογικής ενεργοποίησης και φλεγμονής.¹ Ο suPAR αποτελεί βιοδείκτη που αυξάνει με την παρουσία και την σοβαρότητα της νόσου. Ο suPAR έχει υψηλή αρνητική προγνωστική αξία για τον αποκλεισμό της εξέλιξης της νόσου. Αυτό σημαίνει ότι οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα suPAR (<3 ng/ml) έχουν καλή πρόγνωση και χαμηλό κίνδυνο επανεισαγωγής στο νοσοκομείο και θνητότητας² υποστηρίζοντας την απόφαση για να δοθεί εξιτήριο στον ασθενή. Τα ψηλά επίπεδα suPAR (<6 ng/ml) αποτελούν ισχυρό δείκτη χρόνιας φλεγμονής και σημαντικό κίνδυνο αρνητικών εκβάσεων συμπεριλαμβανομένης της βραχυπρόθεσμης θνητότητας (στο νοσοκομείο, σε 30 ή 90 ημέρες)³ ενισχύοντας την απόφαση για περαιτέρω εξέταση του ασθενή.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο suPARnostic® περιλαμβάνει εύρος προϊόντων με σήμανση CE/IVD που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του διαλυτού υποδοχέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (suPAR) σε ανθρώπινο πλάσμα με EDTA ή ηπαρίνη, ή σε ορό. Η suPARnostic® AUTO Flex ELISA αποτελεί απλοποιημένη μέθοδο σάντουιτς διπλού μονοκλωνικού αντισώματος όπου το δείγμα και το συζευγμένο με υπεροξειδάση αντίσωμα αντι-SUPAR αναμιγνύονται στην πλάκα ανάμιξης, που περιλαμβάνεται στο κιτ, πριν γίνει η επώαση στα αντι-SUPAR προ-επικαλυμμένα, οπτικά διαυγή πηγαδάκια. Η εξέταση χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού και αρουραίου κατά του ανθρώπινου SUPAR. Το πρότυπο suPAR βαθμονομείται με εσωτερικό πρότυπο (Golden Standard). Όλες οι τιμές υπολογίζονται σύμφωνα με αυτό το πρότυπο για να διασφαλιστεί ότι τα δείγματα από διαφορετικά εργαστήρια ή/και από διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων μπορούν να συγκριθούν άμεσα όταν χρησιμοποιείται η suPARnostic® AUTO Flex ELISA. Οι συγκεντρώσεις του suPAR στην suPARnostic® AUTO Flex ELISA εκφράζονται σε ng/mL.

Στη μέθοδο αυτή οι βαθμονομητές του suPAR, ο ορός ελέγχου και τα δείγματα των ασθενών αναμιγνύονται με το σύμπλοκο υπεροξειδάσης-αντί-suPAR αντισώματος στην άσπρη πλάκα μικροτιτλοδότησης και ανάμιξης. Το διάλυμα μεταφέρεται κατόπιν από την άσπρη στην οπτικά διαυγή πλάκα μικροτιτλοδότησης που είναι προ-επενδυμένη με το αντι-suPAR αντίσωμα. Κατά την επώαση μιας ώρας δημιουργείται σάντουιτς που αποτελείται από το αντίσωμα σταθερής φάσης, το suPAR, και το επισημασμένο με υπεροξειδάση συζευγμένο αντίσωμα. Μετά από έκπλυση για την απομάκρυνση του μη συζευγμένου υλικού προστίθεται στα πηγάδια ένα χρωμογόνο υπόστρωμα. Όσο περισσότερο suPAR υπάρχει στο δείγμα τόσο πιο έντονο είναι το μπλε χρώμα που δημιουργείται. Μετά από επώαση 20 λεπτών στο σκοτάδι η εξέλιξη του χρώματος σταματά με την προσθήκη θειικού οξέος που μεταβάλλει το χρώμα στα πηγαδάκια από μπλε σε κίτρινο. Η απορρόφηση στα

450 nm αξιολογείται με μετρητή μικροπλακών. Η πρότυπος καμπύλη παρασκευάζεται από βαθμονομητές suPAR (standard) και η συγκέντρωση του suPAR στα δείγματα των ασθενών προσδιορίζεται από την προβολή τους στην πρότυπο καμπύλη.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

A. Υλικά που περιλαμβάνονται στο κιτ suPARnostic® AUTO Flex ELISA (Code No. E001)

Το κιτ περιλαμβάνει αντιδραστήρια για 96 εξετάσεις με ως 91 μονά δείγματα ασθενών. Τα αποσπώμενα πηγαδάκια επιτρέπουν να διενεργηθούν όσες εξετάσεις απαιτούνται, πολλές ή λίγες. Σε κάθε δοκιμασία πρέπει να περιλαμβάνονται τουλάχιστον 3 βαθμονομητές (Standards), 1 Τυφλό (Blank), και 1 Ορός ελέγχου (Control). Εάν δεν χρησιμοποιηθούν όλα τα πηγαδάκια, εκείνα που θα περισσέψουν τοποθετούνται ξανά στην σακούλα φύλαξης με ξηραντικό και φυλάσσονται στους 4°C έως ότου απαιτηθούν για την επόμενη ανάλυση.

- 1) **Άσπρη πλάκα μικροτιτλοδότησης**, ανάμειξης (Microtiter Plate) με 96 πηγαδάκια για την ανάμειξη των δειγμάτων, των βαθμονομητών, του ορού ελέγχου και των δειγμάτων με το σύμπλεγμα υπεροξειδάσης σε διαυγή πλαστική σακούλα. Ποσότητα: Μία πλάκα. Προετοιμασία: Έτοιμη προς χρήση.
- 2) **Διαυγής πλάκα μικροτιτλοδότησης** (Microtiter Plate) με αποσπώμενα πηγαδάκια επικαλυμμένα με αντίσωμα αντί-suPAR. Υπάρχουν 96 πηγαδάκια ανά πλάκα σε σακούλα αποθήκευσης από αλουμίνιο με σακουλάκι με ξηραντικό. Ποσότητα: 8 x 12 σειρές από πηγάδια (strips). Προετοιμασία: Έτοιμα προς χρήση.
- 3) **Βαθμονομητές**: Ανασυνδυασμένο suPAR, σε PBS με δικά του πρόσθετα και 0.05% Bronidox® για συντηρητικό. Ποσότητα: Πέντε βαθμονομητές, κάθε φιαλίδιο περιέχει 400 μL με σταθεροποιητή πρωτεΐνης. Για την συγκέντρωση του suPAR στο κιτ αυτής της παρτίδας, δείτε παρακαλώ το χωριστό Αναλυτικό Φύλο Τιμών.
- 4) **Ορός ελέγχου της καμπύλης**: Ανασυνδυασμένο suPAR, σε διάλυμα PBS με δικά του πρόσθετα και 0.05% Bronidox®. Ποσότητα: Ένα φιαλίδιο με 400 μL.
- 5) **Σύμπλεγμα υπεροξειδάσης** (Peroxidase Conjugate) (200 x συμπυκνωμένο): Σύμπλεγμα υπεροξειδάσης με αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινου suPAR σε ρυθμιστικό διάλυμα (περιέχει 50% αιθυλική γλυκόλη) με δικά του πρόσθετα και αντιμικροβιακούς παράγοντες. Ποσότητα: Ένα καφέ φιαλίδιο με 120 μL. Προετοιμασία: Ανάλογα με τον αριθμό των πηγαδιών που θα χρησιμοποιηθούν προετοιμάστε την απαιτούμενη ποσότητα σε κατάλληλο δοχείο και χρησιμοποιήστε την μέσα σε 30 λεπτά.
Προφύλαξη: Ευαίσθησια στο φως, αποφύγετε την άσκοπη έκθεση στο φως. Εξασφαλίστε ότι το μείγμα θα χρησιμοποιηθεί μέσα σε 30 λεπτά από την προετοιμασία.
- 6) **Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης**: Διάλυμα PBS, pH 7.4, με δικά του πρόσθετα και 0.05% Bronidox® για συντηρητικό. Ποσότητα: 1 x 30 mL. Προετοιμασία: Έτοιμο προς χρήση.
- 7) **Διάλυμα TMB**: 3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB). **Προφύλαξη**: Ευαίσθησια στο φως, αποφύγετε την άσκοπη έκθεση στο φως. Ποσότητα: 1 x 15 mL. Έτοιμο προς χρήση. Κρατήστε μόνο την ποσότητα που απαιτείται για κάθε δοκιμασία (με 10% επιπλέον για περιθώριο διαμοίρασης).
- 8) **Ρυθμιστικό διάλυμα πλυσίματος**: 10 x συγκέντρωση του διαλύματος PBS με δικά του πρόσθετα και 0.05% Bronidox® για συντηρητικό. Ποσότητα: Ένα μπουκάλι που περιέχει 100 mL. Προετοιμασία: Αραιώση ένα συν εννέα (1:10) με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό.
- 9) **Διάλυμα τερματισμού**: 0.45 M θειικό οξύ (H₂SO₄). Ποσότητα: 16 mL. Προετοιμασία: Έτοιμο προς χρήση.
- 10) **Μονωτική ταινία**: Ποσότητα τέσσερα φύλα κολλητικής ταινίας.
- 11) **Άδειο πλαστικό δοχείο**: Για την προετοιμασία του συμπλέγματος, εάν απαιτείται. Ποσότητα: Ένα μπουκάλι. Έτοιμο προς χρήση.

B. ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Ρυθμιζόμενη πιπέτα με ρύγχη, 10 μL-100 μL, 100 μL-1000 μL.
 - Πολυκάναλη ρυθμιζόμενη πιπέτα ακριβείας, 50-300 μL.
 - Δοχεία αντιδραστηρίων ή/και σωληνάκια για την προετοιμασία των αραιώσεων.
 - Χρονόμετρο.
 - Απιονισμένο ή δισαπεσταγμένο νερό.
 - Μετρητής πλακών μικροτιτλοδότησης ικανός να διαβάσει την απορρόφηση στα 450 nm και με πρόσθετο φίλτρο αναφοράς στα 650 nm για μέτρηση σε διπλό μήκος κύματος (450-650 nm).
- Μηχάνημα έκπλυσης για μικροπλάκες ELISA, υδροβολέας ή άλλο κατάλληλο δοχείο για την έκπλυση των πηγαδιών.
- Απορροφητικό χαρτί ή ύφασμα.
 - Ψυγείο.

Γ. ΦΥΛΑΞΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Αποθηκεύστε τα συστατικά του κιτ στους 2-8°C. Η ημερομηνία λήξης αναγράφεται στις ετικέτες.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ

- Για επαγγελματική χρήση.
- Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά του κιτ πέραν της ημερομηνίας λήξης.
- Μην αναμιγνύετε αντιδραστήρια από κιτ διαφορετικών παρτίδων.
- Διάλυμα τερματισμού–στοιχείο νούμερο 9–περιέχει 0.45 M θειικό οξύ, αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια.
- Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε υπερβολικό φως.
- Μην καταψύχετε τα συστατικά του κιτ.
- Χρησιμοποιείτε μόνο τα πηγαδάκια που παρέχονται στο κιτ.
- Μη βάζετε την πιπέτα στο στόμα σας ή μην καταπίνετε τα αντιδραστήρια.
- Μην καπνίζετε, τρώτε ή πίνετε όταν διενεργείτε την εξέταση ή σε περιοχές όπου χρησιμοποιούνται δείγματα και αντιδραστήρια.
- Μην αναμιγνύετε δείγματα διαφορετικών ασθενών ή διαφορετικά δείγματα του ίδιου ασθενή.
- Τα ανθρώπινα δείγματα μπορεί να είναι μολυσμένα από μολυσματικούς παράγοντες. Μην καταπίνετε, μην εκθέτετε ανοιχτά τραύματα ή μην αναπνέετε αερολύματα. Φοράτε προστατευτικά γάντια.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ

Για να παρασκευάσουμε τα δείγματα πλάσματος, συλλέγουμε ολικό αίμα σε σωληνάκι φυγοκέντρησης που περιέχει αντιπηκτικό EDTA ή ηπαρίνη. Φυγοκεντρούμε το αίμα σε 3000 x g για 10 λεπτά. Τα δείγματα του ορού παρασκευάζονται σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή των φιαλιδίων συλλογής αίματος.

Μεταφέρετε και αποθηκεύστε τα δείγματα σε διαφορετικά επισημασμένα σωληνάκια. Βάλτε ημερομηνία και όνομα σε κάθε δείγμα. Για μακροχρόνια φύλαξη διατηρείστε στους -20°C. Αποφύγετε επανειλημμένη ψύξη και απόψυξη.

Ισχυρώς αιμολυμένα, λυπαιμικά ή μικροβιακά μολυσμένα δείγματα δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται. Δείγματα με παθολογικά ψηλές τιμές αιμοσφαιρίνης ή χολερυθρίνης μπορεί να επηρεάσουν την διενέργεια της εξέτασης και την ευαισθησία.

Προσέξτε πιθανή αραίωση του suPAR σε περίπτωση μετάγγισης, έγχυσης, κλπ.

Είδος δείγματος	Απαιτούμενη ποσότητα
Πλάσμα ή ορός	15 µL για κάθε ανάλυση

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ-ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΕΙΡΩΝ ΠΗΓΑΔΙΩΝ (MONA)

suPARnostic® AUTO Flex ELISA (Code No. E001)

Αφήστε τα αντιδραστήρια να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου (18-26°C) για 1 ώρα πριν τη χρήση. Προσδιορίστε τον απαιτούμενο αριθμό πηγαδιών για τις δύο πλάκες: τη Λευκή πλάκα ανάμειξης και τη Διαυγή επικαλυμμένη πλάκα. Βγάλτε τη Λευκή πλάκα ανάμειξης από τον κλεισμένο με φερμουάρ σάκο. Μετά τη χρήση, στεγνώστε και επανατοποθετείστε τη Λευκή πλάκα ανάμειξης στο σάκο για μελλοντική χρήση. Κόψτε προσεκτικά την άκρη του σάκου αλουμινίου και βγάλτε τη Διαυγή επικαλυμμένη πλάκα.

Επανατοποθετείστε τα αχρησιμοποίητα πηγάδια στον σάκο αλουμινίου και φυλάξτε τον στους 4°C για μελλοντική χρήση.

Σημείωση: Θυμηθείτε να κρατήσετε τη Λευκή πλάκα ανάμειξης και το πλαίσιο της για μελλοντική χρήση!

Προετοιμασία των ρυθμιστικών διαλυμάτων προ της χρήσης:

Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, διάλυμα εργασίας

1. Αραιώστε την απαιτούμενη ποσότητα του μητρικού διαλύματος, ένα μέρος συν εννέα μέρη (1:10) με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Για χρήση όλης της πλάκας όλη η φιάλη του μητρικού διαλύματος πρέπει να προστεθεί σε 900 mL απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Για κάθε σειρά που θα χρησιμοποιηθεί απαιτούνται τουλάχιστον 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. Μεγαλύτερη ποσότητα διαλύματος έκπλυσης θα απαιτηθεί εάν χρησιμοποιηθεί η αυτόματη συσκευή έκπλυσης. Το διάλυμα της εργασίας μπορεί να διατηρηθεί στους 2-8°C έως 6 μήνες.

Σύμπλοκο υπεροξειδάσης, διάλυμα εργασίας

2. Προετοιμάστε την απαιτούμενη ποσότητα του συμπλέγματος σε καθαρό πλαστικό δοχείο κατάλληλου μεγέθους όπως περιγράφεται στον πίνακα (χρησιμοποιείτε το Ρυθμιστικό διάλυμα Αραίωσης, Συστατικό 6). Για λιγότερες από τρεις ταινίες συνιστάται το Σύμπλεγμα να προστεθεί με μονοκάναλη πιπέτα. Για τρεις ή περισσότερες ταινίες το Σύμπλεγμα μπορεί να προστεθεί με πολυκάναλη πιπέτα. Το Σύμπλεγμα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα σε 30 λεπτά από την παρασκευή του. Το αχρησιμοποίητο μητρικό διάλυμα πρέπει να προστατευθεί από το φως και να φυλαχθεί στους 4°C το ταχύτερο δυνατόν.

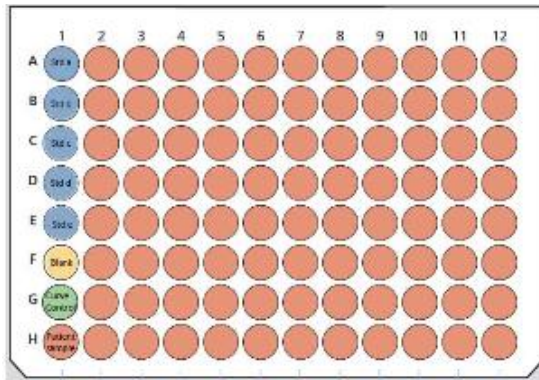
Αριθμός σειρών	Όγκος του μητρικού διαλύματος Συμπλέγματος	Όγκος του διαλύματος αραίωσης
1	15	3
2	20	4
3	25	5
4	30	6
5	35	7

6	40	8
7	45	9
8	50	10
9	55	11
10	60	12
11	65	13
12	70	14

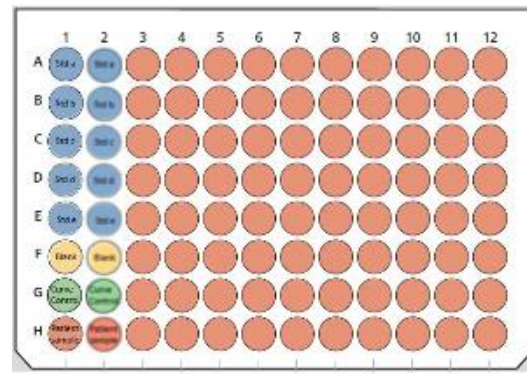
Πίνακας 1. Οι όγκοι του Ρυθμιστικού διαλύματος Αραίωσης και του μητρικού διαλύματος Συμπλέγματος που απαιτούνται για την παρασκευή του μίγματος Συμπλέγματος βάσει του αριθμού των σειρών που θα χρησιμοποιηθούν.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Αποφασίστε τον αριθμό των βαθμονομητών που θα χρησιμοποιήσετε, 3-5 Βαθμονομητές. Σημείωση: Η διαδικασία αυτή βασίζεται σε πέντε Βαθμονομητές.
2. Υπολογίστε τον αριθμό των πηγαδιών που απαιτούνται για τη δοκιμασία και σημειώστε τα στην Άσπρη πλάκα ανάμειξης. Καλύψτε τα πηγάδια που δε θα χρησιμοποιηθούν για να αποφύγετε επιμόλυνση. Μετά τη χρήση στεγνώστε την Άσπρη πλάκα ανάμειξης και τοποθετείστε την στο σάκο με το φερμουάρ για μελλοντική χρήση.
3. Υπολογίστε τον αριθμό των σειρών που απαιτούνται για τη δοκιμασία. Κόψτε προσεκτικά το σάκο αλουμινίου και βγάλτε την πλάκα. Αφαιρέστε τις σειρές που περισεύουν από τη Διαυγή επικαλυμμένη πλάκα και επιστρέψτε τις αχρησιμοποίητες σειρές στο σάκο αλουμινίου με το ξηραντικό, σφραγίστε και φυλάξτε στους 4°C για μελλοντική χρήση. Σημείωση: Μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας εάν δεν έχει χρησιμοποιηθεί ολόκληρη η πλάκα, η πλάκα και τα πλαίσια φυλάσσονται για μελλοντική χρήση.
4. Μεταφέρετε 15 μL από τους Βαθμονομητές (διαυγές καπάκι, 3a, 3b, 3c, 3d και 3e) στα πηγαδάκια A1-E1 στη Λευκή πλάκα ανάμειξης. Συστήνεται να προστίθενται οι βαθμονομητές εις διπλούν.
5. Μεταφέρετε 15 μL από το Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (Συστατικό 6) στο πηγάδι F1 στη Λευκή πλάκα ανάμειξης (Τυφλό). Συνιστάται να μετράται το Τυφλό εις διπλούν.
6. Μεταφέρετε 15 μL από τον ορό ελέγχου καμπύλης (μπλε καπάκι) στο πηγάδι G1 στη Λευκή πλάκα ανάμειξης. Συνιστάται να μετράται το υλικό ελέγχου εις διπλούν.
7. Μεταφέρετε 15 μL από κάθε δείγμα στα επόμενα πηγάδια της Λευκής πλάκας ανάμειξης όπως απαιτείται. Συνιστάται να μετρούνται τα δείγματα εις διπλούν.
Σημείωση: Οι Βαθμονομητές, το Τυφλό, και ο Ορός Ελέγχου καμπύλης πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε κάθε δοκιμασία.



Εικόνα 1: Τυπική κατανομή των Βαθμονομητών, Ορού ελέγχου, Τυφλού και δειγμάτων σε μια πλάκα. Όλα μονά.



Εικόνα 2: Τυπική κατανομή των Βαθμονομητών, Ορού ελέγχου και Τυφλού εις διπλούν. Τα δείγματα μονά ή διπλά.

8. Διανείμετε 135 μ l από το διάλυμα του συμπλέγματος υπεροξειδάσης (προετοιμασία ανωτέρω) σε κάθε πηγάδι. Συνιστάται η χρήση πολυκάναλης πιπέτας οκτώ καναλιών και κατάλληλα σκαφάκια για το αντιδραστήριο.
9. Αναδεύστε ήπια ανεβοκατεβάζοντας το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού με την πιπέτα και κατόπιν μεταφέρετε 100 μ l στο αντίστοιχο πηγάδι στη Διαιυγή επικαλυμμένη πλάκα με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας. Διασφαλίστε ότι χρησιμοποιούνται καινούργια ρύγχη σε κάθε προσθήκη.
10. Καλύψτε τη Διαιυγή επικαλυμμένη πλάκα με μονωτικό κάλυμμα (να έχει κοπή στο επιθυμητό μέγεθος προ χρήσης) για να αποτραπεί η εξάτμιση και αφήστε την πλάκα να επωαστεί για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-26°C) στο σκοτάδι.
11. Βγάλτε προσεκτικά το μονωτικό κάλυμμα και απορρίψτε το περιεχόμενο των πηγαδιών.
12. Πλύνετε τα πηγάδια τρεις φορές, με 250 μ l ανά πηγάδι, με το παρασκευασμένο διάλυμα έκπλυσης με μονοκάναλη ή πολυκάναλη πιπέτα. Αφού αδειάσετε το περιεχόμενο των πηγαδιών διανείμετε 250 μ l 1X διάλυμα έκπλυσης στα πηγάδια και επαναλάβετε ακόμη δύο φορές τη διαδικασία. Εναλλακτικά το διάλυμα έκπλυσης μπορεί να προστεθεί στα πηγάδια με υδροβολέα. Χτυπήστε ελαφρά την πλάκα σε απορροφητικό χαρτί μεταξύ των εκπλύσεων. Στεγνώστε προσεκτικά την πλάκα μετά το τελικό πλύσιμο και βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες στα πηγάδια. **Σημείωση:** Το ακατάλληλο πλύσιμο θα φέρει λανθασμένα αποτελέσματα. Αυτό το στάδιο πρέπει να γίνει προσεκτικά. Μην αφήσετε τα πηγάδια να στεγνώσουν μεταξύ των επώσεων.
13. Προσθέστε 100 μ l διαλύματος TMB σε κάθε πηγάδι, καλύψτε τη Διαιυγή επικαλυμμένη πλάκα με μονωτικό κάλυμμα και αφήστε να επωασθεί για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18-26°C) στο σκοτάδι. **Σημείωση:** Το διάλυμα TMB μολύνεται εύκολα. Αφαιρέστε από το φιαλίδιο μόνο την απαιτούμενη ποσότητα για την δοκιμασία (συμπεριλαμβανομένου 10% επιπλέον για ασφάλεια). Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα TMB. Μην το επιστρέψετε στο φιαλίδιο.
14. Αφαιρέστε το μονωτικό κάλυμμα και σταματήστε την αντίδραση προσθέτοντας 100 μ l Διάλυμα Τερματισμού σε κάθε πηγάδι. Το χρώμα πρέπει να αλλάξει από μπλε σε κίτρινο λόγω της μεταβολής του pH.
15. Διαβάστε την απορρόφηση στα 450 nm εντός 30 λεπτών από το τέλος της αντίδρασης. **Σημείωση:** Για φωτόμετρα διπλού μήκους κύματος χρησιμοποιείστε φίλτρο αναφοράς στα 650 nm περίπου. Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες στα πηγάδια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ–ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΕΙΡΩΝ ΠΗΓΑΔΙΩΝ (ΜΟΝΑ)

Η Λευκή πλάκα ανάμειξης χρησιμοποιείται σε όλα τα επόμενα στάδια:

Προσθέστε τους Βαθμονομητές, τον Ορό Ελέγχου, το Τυφλό και τα δείγματα	15 μL/πηγάδι
Σε όλα τα πηγάδια: Προσθήκη του διαλύματος εργασίας του συμπλέγματος ενζύμου* και ανάδευση	135 μL/πηγάδι
Σε όλα τα πηγάδια: Μεταφορά των αραιωμένων δειγμάτων από τη Λευκή πλάκα ανάμειξης στη Διαυγή επικαλυμμένη πλάκα*	100 μL/πηγάδι

Τα διαυγή επικαλυμμένα πηγάδια χρησιμοποιούνται σε όλα τα επόμενα στάδια:

Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-26°C) στο σκοτάδι	1 ώρα
Άδειασμα της πλάκας και πλύσιμο (250μL/well)	3 κύκλοι
Προσθήκη του διαλύματος TMB*	100 μL/πηγάδι
Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-26°C) στο σκοτάδι	20 λεπτά
Προσθήκη διαλύματος τερματισμού*	100 μL/πηγάδι
Μέτρηση απορρόφησης	450 nm
Φίλτρο αναφοράς, προαιρετικό	650 nm

*Χρήση οκτακάναλης πιπέτας εάν χρησιμοποιούνται περισσότερες από τρεις σειρές πηγαδιών.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η εταιρεία ViroGates έχει δημιουργήσει ένα πρόγραμμα για τον υπολογισμό των τιμών του suPAR από τις τιμές της απορρόφησης στα 450 nm. Το πρόγραμμα διατίθεται δωρεάν και μπορεί κανείς να το προμηθευτεί από το www.virogates.com ή να το ζητήσει με e-mail στο info@virogates.com.

Εναλλακτικά υπολογίστε τη διορθωμένη απορρόφηση αφαιρώντας την απορρόφηση του τυφλού από όλα τα πηγάδια της δοκιμασίας (0 ng/mL). Κατασκευάστε πρότυπη καμπύλη σε γραμμικό σύστημα συντεταγμένων σχεδιάζοντας τη διορθωμένη απορρόφηση του βαθμονομητή (τεταγμένη, γ-άξονας) έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης του suPAR (τετμημένη, x-άξονας). Σχεδιάστε τη βέλτιστη καμπύλη (Εικόνα 2).

Προσδιορίστε τη συγκέντρωση του suPAR για τον ορό ελέγχου και για τα δείγματα των ασθενών με προβολή στην καμπύλη. Δεν συνιστάται η αραίωση των δειγμάτων των ασθενών.

Έλεγχος καμπύλης (Curve control)

Η συγκέντρωση του suPAR στον ορό ελέγχου πρέπει να κυμαίνεται μέσα στο εύρος που αναφέρεται στο ξεχωριστό Φύλο των αναλυτικών τιμών. Εάν είναι εκτός του εύρους χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για να εξακριβωθεί αν η αιτία είναι η κακή τεχνική, ο ακατάλληλος χειρισμός ή η αλλοίωση των αντιδραστηρίων.

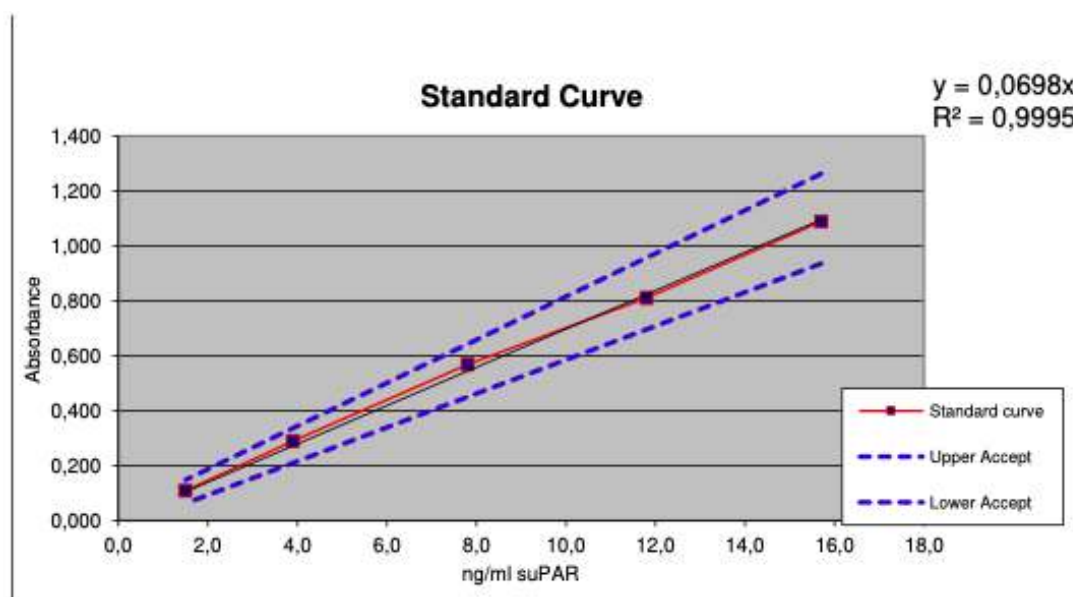


Figure 1 Typical Standard Curve

Absorbance= Απορρόφηση Lower Accept= Κατώτερο Αποδεκτό Όριο, Standard Curve= Πρότυπος Καμπύλη, Upper Accept= Ανώτερο Αποδεκτό Όριο

Εικόνα 1: Τυπική Πρότυπη Καμπύλη

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

A. Ανακρίβεια

Για κάθε ένα από τα πέντε δείγματα πλάσματος η ανακρίβεια υπολογίστηκε από τις μέσες τιμές οκτώ διπλών προσδιορισμών σε πέντε διαφορετικές μετρήσεις. Οι τυπικές αποκλίσεις και οι συντελεστές διακύμανσης παρατίθενται στον επόμενο πίνακα. Για τα αποτελέσματα αυτά χρησιμοποιήθηκε ένας βαθμονομητής.

Δείγμα (ng/mL)	Εντός της ημέρας CV	Μεταξύ ημερών CV	Ολικό CV	n
2.3	3.5%	5.1%	6.0%	40
2.4	4.7%	3.5%	5.6%	40
3.7	1.3%	2.3%	2.4%	14
5.4	2.1%	2.2%	2.9%	16
7.2	1.7%	1.7%	2.3%	16

B. LOB, LOD, LOQ

Το όριο του τυφλού δείχνει τη διακύμανση του τυφλού δείγματος. Σε αυτή τη περίπτωση ήταν συνένωση δειγμάτων ανθρώπινου πλάσματος που αραιώθηκε με διάλυμα αραιώσης σε αναλογία 1+15.

LOB=0.1 ng/mL

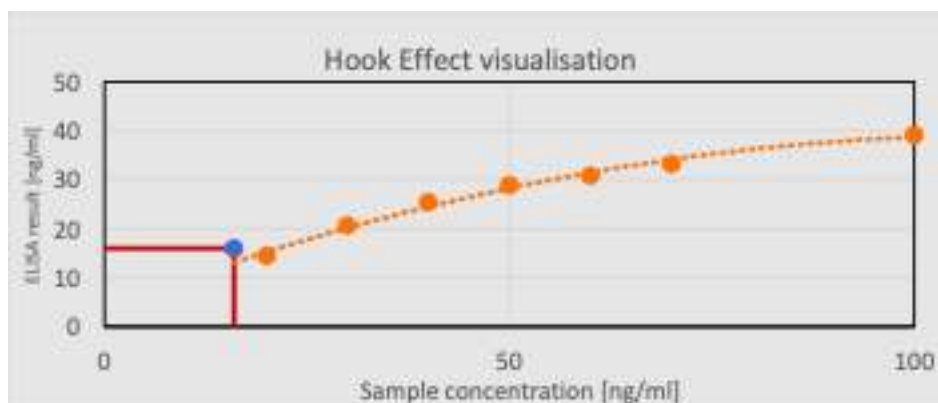
Το όριο ανίχνευσης (LOD) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση suPAR που είναι δυνατόν να ανιχνευθεί και δεν είναι το τυφλό.

LOD=0.4 ng/mL

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση του suPAR που μπορεί αξιόπιστα να ανιχνευθεί εφόσον πληρούνται κάποιοι προκαθορισμένοι στόχοι που αφορούν στις αποκλίσεις και στην ανακρίβεια. Το LOQ μπορεί να είναι ίδιο με το LOD ή ψηλότερο.

LOQ=LOD

Γ. Φαινόμενο «αγκίστρου» (Hook effect)



Hook Effect visualization= Οπτικοποίηση του φαινομένου «αγκίστρου»(Hook Effect), Sample concentration ng/ml= Συγκέντρωση δείγματος ng/mL

Παρατήρηση: Δεν παρατηρείται hook effect σε συγκεντρώσεις suPAR ως 100 ng/mL σε εμβολιασμένο ανθρώπινο πλάσμα.

Σημείωση: Μετρήθηκαν συγκεντρώσεις του suPAR εύρους 0-500 ng/mL. Ανωτέρω απεικονίζεται το εύρος 0-100 ng/mL.

Τα αποτελέσματα των 200 και 500 ng/mL ήταν σταθερά στο μέγιστο επίπεδο των 40 ng/mL. Αυτό αποτελεί περιορισμό της ELISA και της απόδοσης του φωτόμετρου διότι η μέγιστη οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετά το διάλυμα TMB και το διάλυμα τερματισμού είναι 3.0 (1.0 στα 15 ng/ml).

ΔΙΑΧΕΙΡΗΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Απομακρύνετε τα αχρησιμοποίητα αντιδραστήρια και απόβλητα σύμφωνα με τους εθνικούς, ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς και τοπικούς κανονισμούς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Desmedt S, Desmedt V, Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. The intriguing role of soluble urokinase receptor in inflammatory diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2017;54(2):117-33. doi: 10.1080/10408363.2016.1269310.
2. Rasmussen LJ, Ladelund S, Haupt TH, Ellekilde G, Poulsen JH, Iversen K, Eugen-Olsen J, Andersen O. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) in acute care: a strong marker of disease presence and severity, readmission and mortality. A retrospective cohort study. *Emerg Med J.* 2016;33(11):769-75. doi: 10.1136/emmermed-2015-205444.
3. Rasmussen LJH, Ladelund S, Haupt TH, Ellekilde GE, Eugen-Olsen J, Andersen O. Combining national early warning score with soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) improves risk prediction in acute medical patients: a registry-based cohort study. *Crit Care Med.* 2018;46(12):1961-8. doi: 10.1097/CCM.0000000000003441.