



**PROTILÁTKY PROTI SACCHAROMYCES
CEREVISIAE – IgG/IgA (ASCA)**

ELISA
MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

Kód 44872	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagenty pro stanovení ASCA protilátek. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

PRINCIP METODY

Anti-Saccharomyces cerevisiae protilátky ze séra se váží na antigen navázaný na povrchu mikrotitračních destiček. V průběhu druhé inkubace se váže konjugát (křenovou peroxidázou značené imunoglobuliny proti lidskému IgG nebo IgA) s protilátkami navázanými na povrchu jamky. Nakonec se přidává 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) s H₂O₂ do každé jamky jako enzymový substrát. Vzniklá enzymatická barevná reakce je zastavena kyselinou. Žluté zabarvení reakce se měří při 450 nm a intenzita absorbance je úměrná koncentraci ASCA protilátek ve vzorku¹.

OBSAH A SLOŽENÍ

- A. Koncentrovaný promývací roztok.** 50 mL. Koncentrovaný fosfátový pufr, azid sodný 15 mmol/L.
- B. Ředící roztok** 100 mL. Tris, azid sodný 15 mmol/L.
- C+. Pozitivní kontrola IgG/IgA** 1,5 mL. Ready to use. Sérum s IgG/IgA ASCA protilátkami, azid sodný 15 mmol/L.
- C-. Negativní kontrola.** 1,5 mL. Ready to use. Lidské sérum bez ASCA protilátek, azid sodný 15 mmol/L.
- DG. Konjugát IgG** 15 mL. Křenovou peroxidázou značené polyklonální králičí imunoglobuliny proti lidskému IgG.
- DA. Konjugát IgA** 15 mL. Křenovou peroxidázou značené polyklonální králičí imunoglobuliny proti lidskému IgA.
- E. Substrát.** 15 mL. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB).
- F. Zastavovací roztok. 15 mL. Kyselina fosforečná 4,5%. H314** – Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.
P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P303 + P361 + P353 – PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte.
- M. Mikrotitrační destičky:** 12 modulů po 8 rozlamovatelných jamkách s navázaným vysoce purifikovaným mananem kvasinky Saccharomyces cerevisiae.
- S1-S6. Standardy ASCA IgG/IgA,** Každý po 1,5 mL. Ready to use. Lidské sérum IgG/IgA ASCA protilátkami. Azid sodný 15 mmol/L. Koncentrace protilátek ASCA IgG/IgM jsou: 0; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 U/mL, jak je uvedeno na štítku lahviček. Kalibrováno proti internímu referenčnímu standardu.

Pro další varování a doporučení – viz Karta bezpečnostních údajů (SDS).

Lidská séra použitá při přípravě pozitivní a negativní kontroly byla testována a sledována negativně na přítomnost protilátek anti-HIV a anti-HCV, a stejně tak na HBs antigen. Nicméně zacházejte s kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.

SKLADOVÁNÍ

Skladujte při 2-8°C. Reagenty jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno kontaminaci v průběhu jejich užívání.

Známky zhoršení kvality:

- Kapalné komponenty: Přítomnost částic, zákal
- Mikrotitrační destičky: natržením sáčku, makroskopické defekty jako je poškrábání dna jamek.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Promývací pufr: Zředte koncentrovaný promývací pufr A destilovanou vodou v poměru 1/20. Pořádně promíchejte. Pro 1 strip se spotřebuje přibližně 50 ml promývacího reagentu. Roztok je stabilní 30 dnů při 2-8°C. Ostatní činidla jsou připravena k přímému použití - ready to use.

PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- zvlhčovací komůrka
- promývací zařízení pro mikrotitrační destičky
- reader nebo fotometr s mikrokyvetou a filtrem 450 ± 10 nm.

VZORKY

Sérum nebo plazma odebraná standardním způsobem. Vzorek před testováním zředte 1/100 ředícím pufr (B). K testování vždy používejte čerstvě naředěný vzorek.

PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte všechna činidla na pokojovou teplotu (Pozn.: 1).
2. Otevřete balíček s mikrotitračními destičkami a vyjměte požadované množství pro stanovení (Poznámka 2).
3. Postup práce:
 - **Kvantitativní stanovení:** Pipetujte po 100 µL každého standardu IgG/IgA (S1-S6), Pozitivní kontroly IgG/IgA (C+), Negativní kontroly (C-) a zředěného vzorku do odlišných jamek.
 - **Kvalitativní stanovení:** Pipetujte 100 µL standardu S3 IgG/IgA, Pozitivní kontroly IgG/IgA(C+), Negativní kontroly (C-) a zředěného vzorku do odlišných jamek. Pipetujte 100 µL ředícího roztoku (B) jako blank.
4. Stripy umístěte do zvlhčovací komůrky a inkubujte je při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
5. Odsajte obsah jamek a jamky promyjte 3-krát po 300 µL promývacího pufru vždy po dobu nejméně 10 sekund (Poznámka 3 a 4).
6. Pipetujte do všech jamek 100 µL konjugátu DG nebo DA.
7. Stripy inkubujte ve zvlhčovací komůrce při pokojové teplotě po dobu 15 minut.
8. Promyjte jamky podle odstavce č. 5.
9. Pipetujte 100 µL substrátu (E) do všech jamek.
10. Stripy inkubujte ve zvlhčovací komůrce při pokojové teplotě po dobu 15 minut.
11. Pipetujte 100 µL zastavovacího roztoku (F) do všech jamek a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. (Poznámka 5).
12. Odečtěte absorbanci jednotlivých jamek při 450 nm za použití S1 standardu nebo jamky blanku pro vynulování přístroje. Zbarvení je stabilní po dobu nejméně 30 minut.

VÝPOČET

Kvantitativní stanovení: Vyneste do grafu hodnoty absorbance pro každý standard proti koncentraci ASCA (IgG nebo IgA, v U/mL). Koncentrace ASCA protilátek přítomných ve vzorku se vypočítá interpolací absorbance na kalibrační křivce (doporučená křivka: 4-parametrická logistická).

Kvalitativní stanovení: Vypočtěte absorbanci Cut-off následovně:

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} S3 \times 0,80 \text{ (IgG)}$$

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} S3 \times 0,80 \text{ (IgA)}$$

Vypočtěte absorbanční poměr:

$$\text{Absorbanční poměr} = \frac{A_{450 \text{ nm}} \text{ Vzorku}}{A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off}}$$

Jestliže jsou hodnoty absorbancí vyšší než je horní měřicí limit readeru, naředte vzorky reagentem (B) a stanovení opakujte.

REFERENČNÍ HODNOTY

Vzorky, s koncentrací větší jak 10 U/mL, nebo které mají absorbanční poměr vyšší jak 1,0 jsou považovány za pozitivní pro IgG/IgA.



ASCA – IgG/IgA (ASCA)



PROTILÁTKY PROTI SACCHAROMYCES CEREVISIAE – IgG/IgA (ASCA)

ELISA
MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

Kód 44872	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagenty pro stanovení ASCA protilátek. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

Vzorky, s koncentrací nižší jak 10 U/mL, nebo které mají absorbanční poměr nižší jak 1,0 jsou považovány za negativní pro IgG/IgA. Uvedené hodnoty jsou pouze orientační. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí.

KONTROLA KVALITY

Absorbance standardu S6 by měla být vyšší než 1,300 U/mL pro IgG i IgA. Koncentrace IgG/ IgA Pozitivní kontroly (C+) by měla být v rozmezí od 30 do 50 U/mL a Negativní kontroly (C-) by měla být nižší jak 10 U/mL pro IgG/IgA. Absorbanční poměr pro Negativní kontrolu (C-) by měl být nižší než 1,0.

Každá laboratoř by si měla stanovit svojí vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

– Opakovatelnost (jednoho vzorku):

ASCA (IgG)			ASCA (IgA)		
U/mL	CV %	n	U/mL	CV%	n
9,6	4,3	9	5,1	5,2	9
19,3	6,6	9	26,8	6,5	9
76,5	8,8	9	66,4	6,1	9

– Reprodukovatelnost (run to run):

ASCA (IgG)			ASCA (IgA)		
U/mL	CV %	n	U/mL	CV%	n
9,6	7,1	24	5,1	6,6	24
19,3	3,8	24	26,8	6,0	24
76,5	7,5	24	66,4	6,4	24

- Detekční limit: pro IgG/IgA je 1,0 U/mL .
- ASCA IgG/IgA souprava je specifická pouze ke stanovení protilátek proti mananu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.
- Interference: Hemoglobin do 1000 mg/dL, bilirubin do 40 mg/dL a triglyceridy do 3000 mg/dL neinterferují. Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat².
- Rozsah měření: 1,0–100 U/mL pro IgG/IgA. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředte vzorek ředícím puřem (B) a opakujte stanovení.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Stanovení ASCA protilátek s použitím kombinace perinukleárních anti-neutrofilových cytoplazmatických protilátek (p-ANCA a ASCA) se využívá při diagnostice zánětlivého onemocnění střev, zejména při rozlišování mezi Cronovou chorobou a ulcerózní kolitidou, hlavně když je kolitida nespecifická.³ ASCA sú silně spojené s Cronovou chorobou. IgA a IgG ASCA protilátky sa často vyskytují u pacientů s Cronovou chorobou (50-80%) v porovnání s pacienty s ulcerózní kolitidou (2-14%) a s normálními zdravými jedinci (1-7%)⁴ Přibližně 2/3 pacientů s Cronovou chorobou, kteří jsou ASCA IgG pozitivní, jsou současně i ASCA IgA pozitivní. Asi 0 -19% pacientů jsou pozitivní pouze na ASCA IgA. U vzorků pacientů s Cronovou chorobou, které byly pozitivní na obě protilátky (IgG i IgA) byla zjištěna specificita 90%, zejména jestli koncentrace protilátek IgA/IgG dosahovala vysokých hodnot.⁵

Citlivost se pohybuje v rozmezí od 41 do 76%.⁶ Hladiny ASCA IgG a IgA u pacientů s Cronovou chorobou jsou vysoce variabilní. Prevalence ASCA je výrazně vyšší v případech sporadického výskytu onemocnění Cronovou chorobou.

V rodinách, ve kterých se vyskytuje pouze Cronova choroba, je to 63% v porovnání s rodinami, kde byl výskyt jak Cronovy choroby tak i ulcerózní kolitidy, kde je to 33%.⁵ BioSystem ASCA IgG souprava vykazuje senzitivitu na úrovni 75% a specificitu 77,5%.

M44872i-03

Studie byla provedena se 192 vzorky.

V případě ASCA IgA senzitivita byla 62,5% a specificita 64,1%. Studie byla provedena se 192 vzorky. Podrobnosti studie jsou dostupné na vyžádání.

Klinická diagnóza by neměla být stanovena jen na základě výsledku jednoho testu, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

POZNÁMKA

1. Nezaměňujte reagenty ze souprav různých šarží.
2. Skladujte nepoužité jamky v plastickém sáčku a uzavřete je společně s vysoušecím sáčkem.
3. Nepoškodte vnitřní povrch mikrotitračních destiček.
4. Promývací roztok by měl být kompletně odstraněn z jamek.
5. Zastavovací roztok (F) enzymové reakce musí být pipetován do jamek přibližně ve stejném časovém odstupu jako substrát (E) v odstavci č.9.

LITERATURA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
3. Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthileul P, Cortot A, Grandbastien B, Charrier G, Targan SR, Colombel JF, Poulain D. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. Gut 1998; 42: 788-791.
4. Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P. Diagnostic value of anti-*Saccharomyces cerevisiae* and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2001; 96: 730-734.
5. Norman GL. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in inflammatory bowel disease. Clin Applied Immunol Rev 2001; 2: 45-63.
6. Vermeire S, Joossens S, Peeters M, Monsuur F, Marien G, Bossuyt X, Groenen P, Vlietinck R, Rutgeerts P. Comparative study of ASCA (Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody) assays in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2001; 120: 827-833.

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 15.6.2018

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí.

Originální návod najdete v soupravě a na internetové adrese: www.biosystems.es.

Český návod je k dispozici na: www.iktrading.cz

Výhradní distributor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5,150 21 Praha5, tel.: +420 257 220 760

SK : JK-Trading spol.s.r.o., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava, tel.: + 421 264 774 591

V případě mimořádných událostí:

ČR : Toxikologické informační středisko (TIS), klinika pracovního lékařství VFN a LF UK,

tel.: +420 224 91 92 93 a +420 224 91 54 02

SK : Toxikologické informačné centrum Bratislava, 833 05, Limbová 5, tel.: +421 254 774 166