



ASCA – IgG/IgA (ASCA)



Kód 44872	96 testov	ASCA – IgG/IgA
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagenty pre stanovenie ASCA. Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

ELISA
Mikrotitračné doštičky

PRINCÍP METÓDY

Protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) zo séra reagujú s antigénom, ktorý je imobilizovaný na povrchu mikrotitračných doštičiek.

V priebehu druhej inkubácie sa viaže konjugát (polyklonálne králičie imunoglobulíny proti ľudskému IgA/IgG značené chrenovou peroxidázou) s protilátkami na povrchu jamky. Nakoniec sa pridá do každej jamky 3,3',5,5' – tetrametylbenzidín (TMB) s H₂O₂ ako enzýmový substrát. Dochádza k enzymatickej farebnej reakcii, ktorá je zastavená kyselinou. Absorbancia vzniknutého žltého komplexu sa meria pri 450nm, pričom hodnota absorbancie je úmerná koncentrácii protilátok vo vzorke. ¹

OBSAH A ZLOŽENIE

- A. Koncentrovaný premývací roztok.** 50 ml. Koncentrovaný fosfátový pufer, azid sodný 15mmol/l.
- B. Riediaci roztok.** 100ml. Tris, azid sodný 15mmol/l.
- C+. IgA/IgG pozitívna kontrola.** 1,5ml. Pripravené k priamemu použitiu. Sérum s IgA a IgG ASCA, azid sodný 15mmol/l.
- C-. Negatívna kontrola.** 1,5ml. Pripravené k priamemu použitiu. Ľudské sérum bez ASCA, azid sodný 15mmol/l.
- DG. IgG Konjugát.** 15ml. Polyklonálne králičie imunoglobulíny proti ľudskému IgG značené chrenovou peroxidázou.
- DA. IgA Konjugát.** 15ml. Polyklonálne králičie imunoglobulíny proti ľudskému IgA značené chrenovou peroxidázou.
- E. Substrát.** 15ml. 3,3',5,5' – tetrametylbenzidín (TMB)
- F. Zastavovací roztok.** 15ml. Kyselina fosforečná 4,5%
Výstraha :
H314 – Spôsobuje ťažké poleptanie kože a poškodenie očí.
Upozornenie :
P280 – Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/štit na tvár
P303 + P361+ P353 - Pri styku s kožou (alebo vlasami) :
Všetky kontaminované časti odevu okamžite vyzlečte.
Kožu opláchnite vodou/osprchujte.
- M. Mikrotitračné doštičky.** 12 modulov po 8 odlamovateľných jamkách s naviazaným vysoko purifikovaným mananom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.
- S1 – S6. Štandardy ASCA IgA/IgG** Každý po 1,5 ml. Pripravené k priamemu použitiu. Ľudské sérum s IgA a IgG ASCA, azid sodný 15mmol/l. Koncentrácie ASCA IgG sú 0, 6,25, 12,5 25, 50 a 100 U/ml a sú uvedené na štítku fľaštičky. Koncentrácie ASCA IgA sú 0, 6,25, 12,5 25, 50 a 100 U/ml a sú uvedené na štítku fľaštičky. Kalibrované proti internému referenčnému štandardu.

Ďalšie varovania a upozornenia – viď bezpečnostný list.
Ľudské séra použité pri príprave pozitívnej a negatívnej kontroly boli testované s negatívnym výsledkom na anti-HIV a anti-HCV a rovnako na HBs antigen. I napriek tomu zaobchádzajte s kontrolami ako s potenciónálne infekčným materiálom.

SKLADOVANIE

Skladujte pri 2 – 8°C.
Reagenty sú stabilné do dátumu uvedeného na štítku v prípade, že sú skladované uzatvorené a je zabránené kontaminácii v

priebehu ich používania.

Príznyky zhoršenia kvality :

- Kvapalné reagenty : Prítomnosť zrazeniny, zákalu.
- Mikrotitračné doštičky : natrhnutie sáčku, makroskopické defekty, ako je poškrabanie dna jamiek.

PRÍPRAVA REAGENCIÍ

Premývací pufer : Zriedte koncentrovaný premývací pufer (A) destilovanou vodou v pomere 1/20. Riadne premiešajte. Pre 1 strip sa spotrebuje približne 50 ml premývacieho reagentu. Roztok je stabilný 30 dní pri 2 – 8°C.

Ostatné činidlá sú pripravené k priamemu použitiu.

PRÍDAVNÉ ZARIADENIA

- zvlhčovacia komôrka
- premývacie zariadenie pre mikrotitračné doštičky
- reader mikrotitračných doštičiek alebo fotometer s mikrokvetou a filtrom 450 ±10nm.

VZORKY

Sérum alebo plazma odobraná štandardným spôsobom. Vzorku pred testovaním zriedte v pomere 1/100 riediacim puferom (B). Pre analýzu použijte vždy čerstvo nariadenú vzorku.

POSTUP

1. Vytemperujte všetky činidlá a jamky na izbovú teplotu. (Poznámka1)
2. Otvorte balíček s mikrotitračnými doštičkami (M) a vyberte množstvo potrebné pre stanovenie. (Poznámka 2).
3. **Postup práce :**
 - **Kvantitatívne stanovenie :** Pipetujte po 100µl každého IgA/IgG štandardu (S1-S6), IgA/IgG pozitívnej kontroly (C+), IgA/IgG negatívnej kontroly (C-) a zriedenej vzorky do jednotlivých (odlišných) jamiek.
 - **Kvalitatívne stanovenie :** Pipetujte po 100 µl štandardu IgG/IgA S3, IgA/IgG pozitívnej kontroly (C+), negatívnej kontroly (C-) a zriedenej vzorky do jednotlivých (odlišných) jamiek. Ako blank použite 100µl riediaceho roztoku (B) a napipetujte ho do jednej jamky.
4. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 30 minút pri izbovej teplote.
5. Odsajte obsahy jamiek a premyte ich premývacím puferom 3x po 300 µl. Doba premývania – minimálne 10 sekúnd. (Poznámka 3 a 4).
6. Do všetkých jamiek pipetujte 100µl IgG alebo IgA konjugátu (DG, DA).
7. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 15 minút pri izbovej teplote.
8. Jamky premyte podľa bodu 5.
9. Do všetkých jamiek pipetujte 100µl substrátu (E).
10. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 15 minút pri izbovej teplote.
11. Do všetkých jamiek pipetujte 100µl zastavovacieho roztoku (F) a inkubujte 5 minút pri izbovej teplote. (Poznámka5).
12. Odčítajte hodnotu absorbancie jednotlivých jamiek pri 450 nm pri použití štandardu S1, alebo jamky s blankom pre vynulovanie prístroja. Farba je stabilná najmenej 30minút.



ASCA – IgG/IgA (ASCA)



Kód 44872	96 testov	ASCA – IgG/IgA
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagenty pre stanovenie ASCA. Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		
		ELISA Mikrotitračné doštičky

VÝPOČET

- **Kvantitatívne stanovenie** : Na kalibračnú krivku vyznačte hodnoty absorpcie každého štandardu oproti koncentrácii ASCA (IgG alebo IgA v U/ml). Koncentrácia protilátok prítomných vo vzorke sa vypočíta interpoláciou absorpcie na kalibračnej krivke (odporúča sa použiť 4-parametrickú, logistickú).
- **Kvalitatívne stanovenie** : absorpciu cut-off vypočítajte nasledovne :

$$A_{450nm} \text{ Cut-off} = A_{450nm} \text{ S3 štandard} \times 0,8 \text{ (IgG)}$$

$$A_{450nm} \text{ Cut-off} = A_{450nm} \text{ S3 štandard} \times 0,8 \text{ (IgA)}$$

Vypočítajte absorbančný pomer :

$$\text{absorbančný pomer} = \frac{A_{\text{vzorky}} 450nm}{A_{\text{cut-off}} 450nm}$$

Ak sú hodnoty absorpcií vyššie ako horný limit merania readeru , nariadte vzorky reagentom (B) a stanovenie opakujte.

REFERENČNÉ HODNOTY

Za pozitívne sú považované vzorky s koncentráciou vyššou ako 10 U/ml, alebo ak je ich absorbančný pomer vyšší ako 1,0. Platí pre IgG i IgA.

Za negatívne sú považované vzorky s koncentráciou nižšou ako 10 U/ml, alebo ak je ich absorbančný pomer nižší ako 1,0. Platí pre IgG i IgA.

Uvedené hodnoty sú orientačné, preto by si malo každé laboratórium stanoviť svoje vlastné rozmedzia.

KONTROLA KVALITY

Absorbancia štandardu S6 by mala byť vyššia ako 1,300 pre IgG i IgA.

Koncentrácia pozitívnej kontroly (C+) by mala byť v rozmedzí medzi 30 až 50 U/ml.

Koncentrácia negatívnej kontroly (C-) by mala byť nižšia ako 10 U/ml pre IgG i IgA.

Absorbančný pomer pre negatívnu kontrolu (C-) by mal byť nižší ako 1,0 pre IgG i IgA.

Každé laboratórium by si malo stanoviť svoju vlastnú vnútornú kontrolu kvality a postupy pre nápravu pre prípad, že kontroly nie sú v tolerančnom rozpätí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- opakovateľnosť (jednej vzorky) :

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

- reprodukovateľnosť (run to run) :

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

- detekčný limit : 1,0 U/ml pre IgA i IgG
 - ASCA IgA/IgG súprava je špecifická iba pre stanovenie protilátok proti mananu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.
 - interferencie : hemoglobín do 1000mg/dl, bilirubín do 40mg/dl a triglyceridy do 3000mg/dl neinterferujú. Niektoré druhy liekov a ďalších látok môžu interferovať.²
- Rozsah merania : 1,0 – 100 U/ml. Pre IgA i IgG. Ak získate výsledky s vyššou hodnotou, zriedte vzorku riediacim pufrom (B) a stanovenie opakujte.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Stanovenie ASCA protilátok s použitím kombinácie perinukleárných anti-neutrofilných cytoplazmatických protilátok (p-ANCA a ASCA) sa využíva pri diagnostike zápalového ochorenia čriev a najmä pri rozlišovaní medzi Cronovou chorobou a ulceróznou kolitídou, zvlášť keď je kolitída nešpecifická³. ASCA sú silne spojené s Cronovou chorobou.

IgA a IgG ASCA protilátky sa často vyskytujú u pacientov s Cronovou chorobou (50-80%) v porovnaní s pacientami s ulceróznou kolitídou (2-14%) a s normálnymi zdravými jedincami (1-7%)⁴.

Približne 2/3 pacientov s Cronovou chorobou, ktorí sú ASCA IgG pozitívni, sú súčasne aj ASCA IgA pozitívni. Asi 0 -19% pacientov sú iba ASCA IgA pozitívni.

U vzoriek pacientov s Cronovou chorobou, ktoré boli pozitívne na obe protilátky (IgG i IgA) bola zistená špecificita 90%, najmä ak koncentrácia protilátok IgG/IgA dosahovala vysokých hodôt.⁵ Citlivosť sa pohybuje v rozmedzí od 41 do 76%.⁶

Hladiny ASCA IgG a IgA u pacientov s Cronovou chorobou sú vysoko variabilné. Prevalencia ASCA je oveľa vyššia v prípadoch sporadického výskytu Cronovej choroby. V rodinách, v ktorých sa vyskytuje iba Cronova choroba je to 63% v porovnaní s rodinami, kde bol výskyt jak Cronovej choroby tak



ASCA – IgG/IgA (ASCA)



Kód 44872 96 testov	ASCA – IgG/IgA ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C	
Reagenty pre stanovenie ASCA. Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku	

aj ulceróznej kolitídy, kde je to 33%⁵ BioSystem ASCA IgG súprava vykazuje senzitivitu na úrovni 75% a špecificitu 77,5%. Štúdia bola uskutočnená na 192 vzorkách. Pokiaľ ide o ASCA IgA, senzitivita bola 62,5% a špecificita 64,1%. Štúdia bola uskutočnená na 192 vzorkách. Podrobné informácie o predmetných štúdiách sú dostupné na vyžiadanie.

Klinická diagnóza by nemala byť stanovená len na základe výsledku jediného testu, je potrebné zhodnotiť klinické i ďalšie laboratórne údaje.

POZNÁMKY

1. Nezamieňajte jednotlivé reagenty z rôznych súprav.
2. Nepoužité jamky skladujte v plastikovom sáčku s exsikátorom.
3. Nepoškodte vnútorný povrch mikrotitračných doštičiek.
4. Premývacie roztoky z jamiek by mal byť celkom odstránený.
5. Zastavovací roztok enzýmovej reakcie (F) musí byť pipetovaný do jamiek približne v rovnakom časovom odstupe ako substrát (E) v bode 9 Postupu práce.

LITERATÚRA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACCC Press, 2000.
3. Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthileul P, Cortot A, Grandbastien B, Charrier G, Targan SR, Colombel JF, Poulain D. AntiSaccharomyces 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.

UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 18.6.2018.

Vzhľadom k novej inovácie výrobku sa odporúča prekontrolovať slovenský preklad s originálnym príbalovým letákom tak, že sa porovnajú identifikačné čísla uvedené v zápätí. Originálny návod nájdete v súprave a na internetovej adrese www.biosystems.es.

Slovenský návod je k dispozícii na www.jktrading.cz.

Výhradný distribútor:

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 prípade mimoriadnych udalostí:

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