

AESKULISA

ASCA-A

Objednací kód: **3507**

Aesku.Diagnostics

Mikroforum Ring 2, D-55234 Wendelsheim, Germany

Tel: +49-6734-9627-0 Fax: +49-6734-9627-27

www.aesku.com/diagnostics/english/index.php

BioVendor - Laboratorní medicína a.s.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno

Tel: +420549124111

Domovská stránka: www.biovendor.cz

PRACOVNÍ POSTUP

Pracovní postup

AESKULISA ASCA-A

REF 3507

Obsah

1. Použití	2
2. Klinické využití a princip metody	2
3. Složení soupravy	2
4. Uchovávání, skladování a expirace	3
5. Upozornění	3
6. Odběr vzorků, manipulace a uchování	4
7. Postup stanovení	4
8. Kvantitativní a kvalitativní interpretace	5
9. Technická data	6
10. Charakteristika	6
11. Literatura.....	7

Příloha A : pipetovací schéma
Příloha B: pracovní postup

1. Použití

AESKULISA ASCA-A je enzymoimuno-analytická souprava pro kvantitativní a kvalitativní detekci protilátek proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) v lidském séru, využívající vysoce čištěného mannanu. ASCA specificky rozeznává mannan, který je komponentou vnější buněčné stěny kvasinky. Tato metoda je vysoce specifická a senzitivní pro Crohnovu chorobu.

2. Klinické využití a princip metody

Crohnova choroba je jedním ze dvou hlavních nespecifických střevních zánětů (Inflammatory Bowel Diseases – IBD). IBD je nadřazený termín, který zahrnuje obě primární poruchy způsobující zánět nebo ulcerace v tenkém a tlustém střevě, Crohnovu chorobu i ulcerativní kolitidu. Crohnova choroba postihuje tenké střevo i kolon, zatímco výskyt ulcerativní kolitidy je omezen pouze na kolon. Etiologie není dosud objasněna, ačkoli se spekuluje o genetickém a infekčním podkladu těchto nemocí. Ověřenými diagnostickými metodami jsou kolonoskopie a ileoskopie, žádná sérologická metoda nebyla dosud dostupná. Ačkoli průběh Crohnovy choroby a ulcerativní kolitidy je v mnoha symptomech velmi podobný, jejich možné komplikace a zejména management jsou odlišné, obzvláště je-li nutná chirurgická intervence. Diferenciální diagnostika obou nemocí před započítím terapie je proto rozhodujícím bodem při jejich řešení. U 10-15% pacientů bohužel nelze pomocí současných dostupných diagnostických metod tato onemocnění jasně rozlišit a hovoříme o kolitidě neurčitěho původu.

Bylo zjištěno, že ASCA jsou specifickými markery Crohnovy choroby. Jejich přítomnost je uváděna u 68% pacientů s tímto onemocněním. Detekci ASCA enzymoimunoanalýzou usnadnil průkaz cílového antigenu mannanu, karbohydrátového antigenu obsahujícího mannózu, který je součástí vnější buněčné stěny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

Protože ASCA jsou prvním dostupným vysoce specifickým sérologickým markerem, mohly by se stát velmi důležitým nástrojem při složitém diagnostickém postupu IBD. Navíc jejich vysoká pozitivní předpovědní hodnota nabízí jedinou výhodnou a spolehlivou možnost screeningu a monitoringu rizikových skupin populace.

Princip stanovení

Vzorky séra ředěné 1:101 jsou inkubovány na mikrotitračních destičkách v jamkách pokrytých specifickým antigenem. Jsou-li ve vzorku séra pacienta přítomny protilátky, naváží se na antigen. Jejich nenavázaná frakce se v následujícím kroku vymyje. Poté je přidán konjugát (protilátka proti lidskému imunoglobulinu konjugovaná s křenovou peroxidázou), vzorek inkubován a dojde k reakci s komplexem antigen-protilátka, vzniklém v mikrodestičce v předchozím kroku. Nenavázaný konjugát je v dalším kroku vymyt. Přídavek roztoku substrátu TMB (tetramethylbenzidin) vede k enzymatické kolorimetrické reakci (modrá barva), která je zastavena přidáním zředěné kyseliny (barva se změní na žlutou). Intenzita barvy vzniklé z chromogenu je přímo úměrná množství konjugátu vázaného na komplex antigen-protilátka a potažmo množství původní koncentrace příslušných protilátek ve vzorku zkoumaného séra.

3. Složení soupravy (kitu)

Nutno připravit před použitím:

5x ředící roztok	1 lahvička, 20 ml – 5x koncentrovaný (bílé víčko: žlutý roztok) Obsahuje: Tris, NaCl, BSA, azid sodný < 0,1% (konzervans)
50x promývací roztok	1 lahvička, 20 ml – 50x koncentrovaný (bílé víčko, zelený roztok) Obsahuje: Tris, NaCl, Tween 20, azid sodný < 0,1% (konzervans)

Připravené k použití:

Negativní kontrola	1 lahvička, 1,5 ml (zelené víčko, žlutý roztok) Obsahuje: lidské sérum (ředěné), azid sodný < 0,1% (konzervans)
Pozitivní kontrola	1 lahvička, 1,5 ml, (červené víčko, žlutý roztok) Obsahuje: lidské sérum (ředěné), azid sodný < 0,1% (konzervans)

Cut off kalibrátor	1 lahvička, 1,5 ml, (modré víčko, žlutý roztok) Obsahuje: lidské sérum (ředěné), azid sodný < 0,1% (konzervans)
Kalibrační roztoky	6 lahviček, po 1,5 ml, 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml (žluté roztoky, intenzita barvy roste s koncentrací roztoku) Obsahuji: lidské sérum (ředěné), azid sodný < 0,1% (konzervans)
Konjugát	1 lahvička, 15 ml IgA (červené víčko, červený roztok) Obsahuje: protilátka proti lidskému imunoglobulinu konjugovaná s křenovou peroxidázou
Roztok substrátu TMB	1 lahvička, 15 ml (černé víčko) Obsahuje: stabilizovaný TMB/H ₂ O ₂
Stop činidlo	1 lahvička, 15 ml (bílé víčko, bezbarvý roztok) Obsahuje: 1M kyselina chlorovodíková
Mikrotitrační deska	12x8 jamek v oddělitelných prouzcích Pokrytí jamek viz. bod 1

Jako konzervans je použit azid sodný (T+, R 28 – 32, S ½ - 28 – 45).

Další potřebný materiál (nedodávaný se soupravou)

Přístroj na měření absorbancí mikrotitračních destiček (reader) s filtrem 450 nm, a volitelným 620 nm referenčním filtrem (600-690 nm). Laboratorní sklo (odměrný válec 100-1000 ml), zkumavky pro ředění roztoků. Vortex, pipety s přesností 10, 100, 200, 500, 1000 µl nebo multikanálová pipeta 100-1000 µl. Přístroj na promývání mikrotitračních destiček (300 µl opakovaní nebo multikanálová pipeta nebo automatický systém), adsorbční papír.

Naše testy jsou vyrobeny k použití s purifikovanou vodou odpovídající definici Pharmacopeia USA (USP 26-NF 21) a European Pharmacopeia (Eur. Ph. 4th Ed.).

4. Uchovávání, skladování, expirace

Všechny reagenty a mikrotitrační destičku uchovávejte v originálních obalech při teplotě 2-8 °C. Rekonstituované (rozpuštěné připravené roztoky) jsou při teplotě 4 °C stabilní minimálně 1 měsíc. **Reagentie a mikrotitrační destičky by měly být používány pouze do vypršení expirace, uvedené na každé komponentě. Vyhněte se intenzivní expozici roztoku substrátu TMB světlem. Uchovávejte mikrotitrační destičky v originální fólii včetně desikantu, fólii vždy neprodyšně uzavřete (zalepte).**

5. Upozornění

5.1 Zdravotní rizika

Tento produkt je určen **POUZE PRO POUŽITÍ IN VITRO**. Se soupravou by měl pracovat pouze personál odborně způsobilý a speciálně vyškolený v manipulaci s diagnostickými metodami IN VITRO. Ačkoli tento produkt není za normálních podmínek používání považován za přímo škodlivý nebo nebezpečný, k zajištění maximální bezpečnosti přečtěte následující text:

Doporučení a bezpečnostní opatření

Tato souprava obsahuje potenciálně nebezpečné komponenty. Přestože reagentie soupravy nejsou klasifikovány jako dráždivé vůči očím a kůži, doporučujeme vyhnout se jejich kontaktu s očima a kůží a při práci používat jednorázové rukavice. **POZOR!** Kalibrátory, kontroly a pufrы obsahují azid sodný (NaN₃) jako konzervans. NaN₃ může být toxický při požití nebo při potřísnění kůže nebo proniknutí do očí. NaN₃ může reagovat s olověným nebo měděným potrubím za vytvoření vysoce výbušných kovových azidů. Při likvidaci promyjte odpad proudem vody kvůli zabránění jejich vzniku. Prosíme řiďte se pokyny pro dekontaminaci dle CDC nebo jiných místních/národních pravidel.

Nekuřte, nejezte a nepijte, pracujete-li se soupravou.

Nepipetujte ústy.

Veškerý materiál lidského původu použitý pro výrobu této soupravy (kontroly, standardy atd.) byl schválenými metodami testován a potvrzen negativním na HbsAg, Hepatitis C a HIV 1. Nicméně žádný test nemůže garantovat úplnou absenci virových agens v takovýchto materiálech. Proto zacházejte s kontrolami, standardy a vzorky sér pacientů jako s potenciálně infekčními materiály v souladu s platnými předpisy.

5.2 Obecná pravidla pro použití soupravy

Nesměšujte a nenahrazujte reagentie nebo mikrotitrační destičky s odlišnými čísly šarže.

Pro optimální výkonnost testu umožněte všem komponentám dosáhnout před použitím pokojové teploty (20-32 °C), dobře promíchejte a dodržujte doporučené inkubační schéma.

Inkubace: U automatizovaných systémů doporučujeme test provádět při 30 °C.

Nikdy nevystavujte komponenty teplotám vyšším než 37°C.

Při pipetování roztoku substrátu vždy používejte nové nepoužité špičky. Chraňte toto reagens před světlem. Nikdy nepipetujte konjugát špičkou použitou dříve s jinou reagentií.

Definitivní klinická diagnóza by neměla být založena pouze na výsledcích provedených testů, ale měla by být stanovena lékařem po zhodnocení všech klinických a laboratorních nálezů.

6. Odběr vzorku, manipulace a uschovávání

Používejte přednostně čerstvě získané vzorky séra. Odběr krve musí být proveden podle platných předpisů.

Nepoužívejte ikterické, lipemické, hemolyzované nebo bakteriemi kontaminované vzorky. Séra s obsahem částic by měla být vyčištěna nízkorychlostním odstředěním (<1000 x g). Vzorky krve by měly být odebrány do čistých, suchých a prázdných zkumavek. Po separaci by sérum mělo být ihned použito, případně uschováno v těsně uzavřené zkumavce při teplotě 2-8 °C max. 3 dny, pro delší uschování pak zamraženo na teplotu -20 °C.

7. Postup stanovení

7.1 Přípravy před pipetováním

Naředte koncentrované reagentie

Naředte koncentrovaný ředící roztok 1:5 destilovanou vodou (např. 20 ml + 80 ml).

Naředte koncentrovaný promývací roztok 1:50 destilovanou vodou (např. 20 ml + 980 ml).

Vzorky

Naředte vzorky sér 1:101 s ředícím roztokem (1x) (např. 1000 µl ředícího roztoku (1x) + 10 µl séra. Dobře promíchejte !!

Promývání

Připravte 20 ml naředěného promývacího roztoku (1x) pro 8 jamek, nebo 200 ml pro 96 jamek (např. 4 ml koncentrátu + 196 ml destilované vody).

Automatické promývání:

Zvažte nadbytečný objem požadovaný pro nastavení přístrojů a mrtvý objem robotické pipety.

Manuální promývání:

Slijte tekutinu z jamek obrácením destičky. Energicky poklepejte rámem destičky s jamkami obrácenými dolů na čistý adsorbční papír. Napipetujte 300 µl naředěného promývacího roztoku do každé jamky a počkejte 20 sekund. Opakujte celý postup ještě dvakrát.

Mikrodestičky

Zjistěte počet jamek nezbytný pro provedení testu. Odstraňte nevyužité jamky z rámu, pro uschování je umístěte do poskytnutého plastického obalu spolu s desikantem, v něm neprodyšně zalepte a uchovejte při teplotě 2-8 °C.

7.2 Pracovní postup

Pipetovací schéma je vyobrazeno v příloze A, pracovní postup v příloze B.

Doporučujeme vzorky a kalibrátory testovat v duplikátu.

- Napipetujte 100 µl zředěného séra od každého pacienta do připravených jamek.
- Napipetujte 100 µl kalibračních roztoků NEBO cut-off kalibrátoru a negativních a pozitivních kontrol do připravených jamek.
- Inkubujte 30 minut při teplotě 20-32 °C.
- Promyjte 3x s 300 µl promývacího roztoku (naředěného 1:50).
- Napipetujte 100 µl konjugátu do každé jamky.
- Inkubujte 30 minut při teplotě 20-32 °C.
- Promyjte 3x s 300 µl promývacího roztoku (naředěného 1:50).
- Napipetujte 100 µl roztoku substrátu TMB do každé jamky.

- Inkubujte v temnu 30 minut při teplotě 20-32 °C.
- Napipetujte 100 µl stop činidla do každé jamky za použití stejného postupu, jako při pipetování substrátu.
- Inkubujte minimálně 5 minut.
- 5 sekund opatrně protřepávejte destičku.
- Změřte absorbance při vlnové délce 450 nm (volitelně 450/620 nm) do 30 minut po předchozím kroku.

8. Kvantitativní a kvalitativní interpretace

Pro kvantitativní interpretaci sestrojte křivku vedenou průsečíky bodů vzniklých vnesením hodnot OD (optické denzity), získaných měřením každého kalibračního roztoku na osu Y a korespondujících hodnot koncentrací kalibračních roztoků (U/ml), které leží na ose X. Pro dosažení optimálních výsledků doporučujeme použít log/lin funkce nebo 4-parametrové funkce. Z OD každého zkoumaného vzorku zjistíte korespondující koncentraci protilátek vyjádřenou v U/ml.

NORMÁLNÍ ROZMEZÍ	POZITIVNÍ VÝSLEDKY
≤ 15 U/ml	> 15 U/ml

Příklad standardní křivky

Doporučujeme pipetování kalibračních roztoků pro každé měření v dubletech.

Kalibrační roztoky IgA	OD 450/620 nm	CV %
0 U/ml	0,032	2,8
3 U/ml	0,152	2,6
10 U/ml	0,281	1,2
30 U/ml	0,646	2,4
100 U/ml	1,214	1,7
300 U/ml	2,104	1,6

Příklad výpočtu

Pacient	Opakování (OD)	Průměr (OD)	Výsledek (U/ml)
P 01	0,904/0,937	0,921	58,3
P 02	0,564/0,551	0,558	25,9

Údaje o každé jednotlivé šarži jsou přiloženy v letáku o kontrole kvality. Laboratoře mohou provádět vlastní kontrolu kvality používáním vlastních kontrol a/nebo interních směsných sér, jak uvádějí směrnice EU.

Nepoužívejte tento příklad pro interpretaci výsledků vyšetření vzorků Vašich pacientů !!!

Každá laboratoř by měla stanovit své vlastní referenční rozmezí odvozené od jejich vlastních technik, kontrol, vybavení a populace pacientů s ohledem na její vlastní zavedené postupy.

Pro kvalitativní interpretaci zjistíte optickou denzitu cut-off kalibrátoru a vzorků pacienta. Srovnajte OD vzorků pacienta s OD cut-off kalibrátoru. Všechny vzorky, jejichž OD je vyšší než OD cut-off kalibrátoru, jsou považovány za pozitivní.

Negativní: OD pacient < 0.8 x OD cut-off
Šedá zóna: 0.8 x ODcut-off ≤ OD pacient ≤ 1.2 x ODcut-off
Pozitivní: OD pacient > 1.2 x OD cut-off

9. Technická data

Vyšetřovaný materiál: sérum
Objem vzorku: 10 µl vzorku naředěného 1:101 s 1x ředícího roztoku
Celková inkubační doba: 90 minut při teplotě 20-32 °C
Kalibrační rozmezí: 0-300 U/ml
Detekční limit: 1,0 U/ml
Uschovávání: při 2-8 °C, používejte pouze originální lahvičky
Počet stanovení: 96 testů

10. Charakteristika

10.1 Analytická citlivost

Testováním ředícího pufru (30x) na AESKULISA ASCA-A (kat.č. 7507) byla analytická citlivost této soupravy stanovena na 1,0 U/ml.

10.2 Specifičnost a senzitivita

Mikrodestičky jsou pokryty vysoce čištěným **mannanem získaným ze *S. cerevisiae***. Nebyla zjištěna zkřížená reaktivita s ostatními autoantigeny. Diagnostická senzitivita ASCA protilátek je u pacientů s Crohnovou chorobou 68%. Tato data byla získána pomocí soupravy AESKULISA ASCA-A (kat.č. 7507).

Korelace:

Porovnatelnost dat byla posouzena nejméně na 30 sérech testovaných s AESKULISA kat.č. 7507 a AESKULISA kat.č. 3507. Lineární regresní analýza těchto dvou souprav ukázala, že soupravy jsou rovnocenné. Data lze obdržet na vyžádání.

10.3 Linearita

Touto soupravou byla testována vybraná séra, přičemž byla zjištěna lineární korelace. Nicméně vzhledem k heterogenní povaze lidských autoprotilátek mohou existovat vzorky, které se nebudou chovat v souladu s tímto principem.

VZOREK ČÍSLO	DILUČNÍ FAKTOR	NAMĚŘENÁ KONCENTRACE (U/ML)	PŘEDPOKLÁDANÁ KONCENTRACE (U/ML)	VZÁJEMNÝ POMĚR (%)
1	1 / 100	48,7	49,0	99,4
	1 / 200	23,8	24,5	97,1
	1 / 400	11,4	12,3	92,7
	1 / 800	5,9	6,1	96,7
2	1 / 100	28,6	28,0	102,1
	1 / 200	13,8	14,0	98,6
	1 / 400	7,0	7,0	100,0
	1 / 800	3,4	3,5	97,1

10.4 Přesnost

K určení přesnosti této metody byla posouzena variabilita (intra a inter-assay) a to na reprodukovatelnosti výsledků tří vybraných reprezentativních vzorků reprezentujících rozmezí hodnot nad kalibrační křivkou.

Intra-Assay			Inter-Assay		
Vzorek č.	Průměr (U/ml)	CV (%)	Vzorek č.	Průměr (U/ml)	CV (%)
1	2,7	0,3	1	2,3	0,9
2	23,7	2,7	2	27,3	3,9
3	46,0	3,0	3	54,3	5,7

10.5 Kalibrace

S ohledem na neexistenci mezinárodních referenčních kalibračních hodnot je AESKULISA ASCA-A kalibrována v arbitrárních jednotkách (U/ml).

11. Literatura

1. **Seibold F, Stich O, Hufnagel R, Kamil S, Scheurlen M (2001).**
Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in inflammatory bowel disease: a family study.
Scand J Gastroenterol 36: 196-201.
2. **Sendid B, Colombel JF, Jacquinot PM et al. (1996).**
Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease.
Clin Diagn Lab Immunol 3: 219-226.
3. **Giaffer MH, Clark A, Holdsworth CD (1992).**
Antibodies to Saccharomyces cerevisiae in patients with Crohn's disease and their possible pathogenic importance.
Gut 33: 1071-1075.

DODATEK A: Pipetovací protokol

Doporučujeme pipetování průběžných zředěných roztoků referenční plazmy, kontrol a vzorek tímto způsobem:

Pro **kvantitativní vyhodnocení** použijte průběžné zředěné roztoky referenční plazmy k vytvoření kalibrační křivky.

DODATEK B: Postup stanovení

Biovendor laboratorní medicína a.s.
Poslední aktualizace: 11/2011

36