



**BIOGEMA**

Garbiarska 2, 04001 KOŠICE



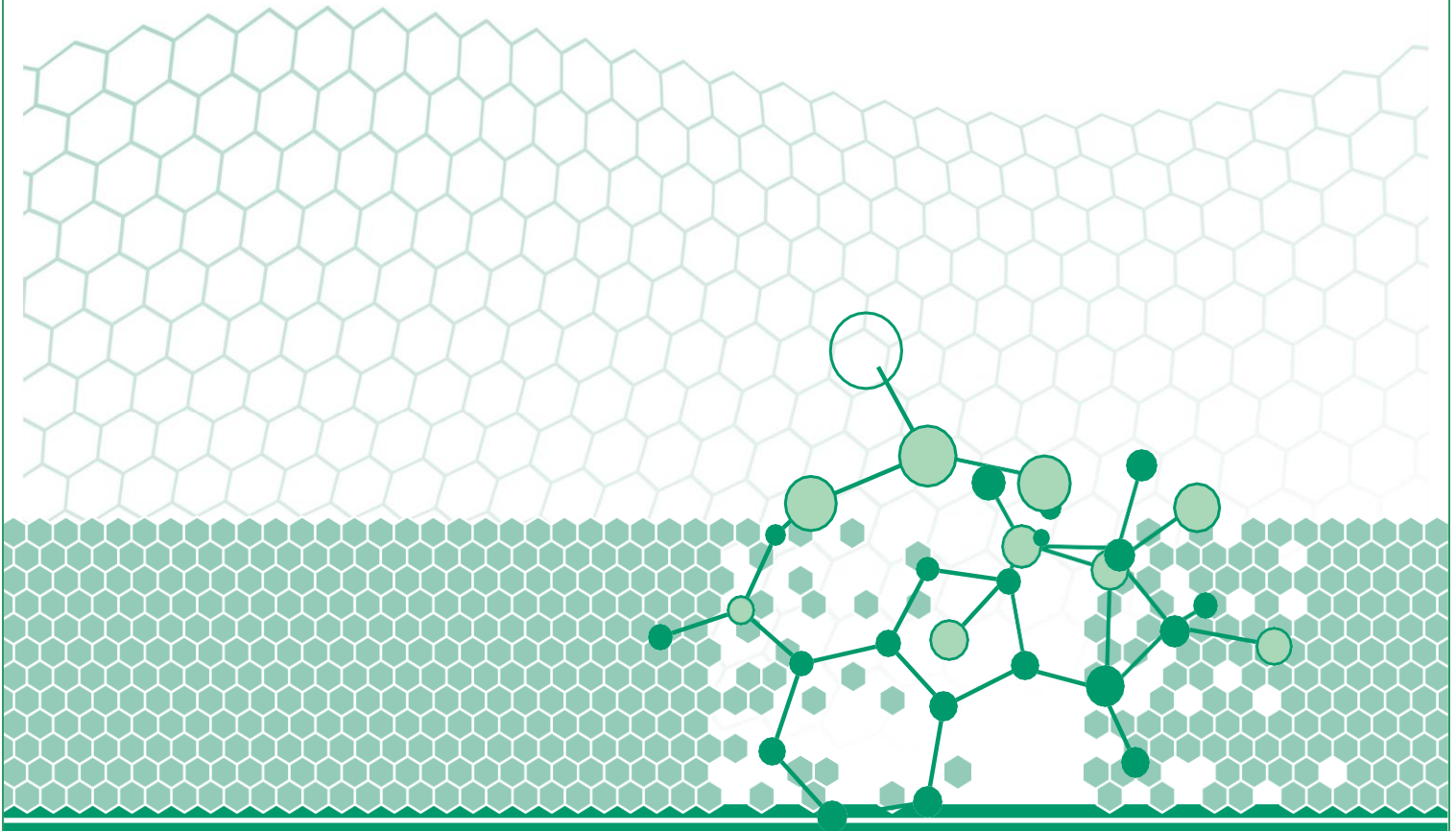
Návod na použitie

## ELISA-anti-ASCA-II-G

REF E-347



IVD



Súprava ELISA-anti-ASCA-II-G je určená na kvantitatívne stanovenie špecifických protilátok ASCA (anti *Saccharomyces cerevisiae* antibodies) triedy IgG proti antigénom mannanu zo stien *Saccharomyces cerevisiae* (pekárenské droždie) v ľudskom sére. Umožňuje stanovenie 40 neznámych vzoriek v duplikátoch.

Kmene *Saccharomyces cerevisiae* sú využívané v potravinárskych technológiách, a preto sú obsiahnuté v rade potravinárskych výrobkov. V poslednej dobe sa začalo využívať stanovenie protilátok proti *Saccharomyces* ako doplnkové vyšetrenie na zlepšenie diagnostických možností nešpecifických črevných zápalov. Tieto protilátky boli zistené u pacientov s Crohnovou chorobou, ale len výnimočne u pacientov s ulceróznou kolitídou. Podľa literárnych údajov sa IgA a IgG protilátky proti *Saccharomyces* vyskytujú u 39-68% pacientov s Crohnovou chorobou, ale len u max. 14% pacientov s ulceróznou kolitídou. Na doplnenie diagnostiky sa odporúča ešte aj stanovenie ANCA (protilátok proti cytoplazmatickým komponentom neutrofilných leukocytov, podtyp s periférnym sfarbením). Výskyt ANCA je spojený s ulceróznou kolitídou. Zvýšené hladiny protilátok IgA a IgG proti *Saccharomyces* boli zistené aj u iných ochorení, ako sú napr. celiakia, spondyloartropatia, ankylozujúca spondylitída, a u niektorých autoimúnnych pečenej ochorení. U 14-43% pacientov s celiakiou boli zistené aj protilátky proti *Saccharomyces*. Na druhej strane IgA protilátky proti gliadínu boli nájdené u 10-35 % pacientov s Crohnovou chorobou.

## PRINCÍP

Stanovenie je založené na princípe nepriamej ELISA metódy na detekciu špecifických protilátok. Antigen je imobilizovaný na povrchu jamiek mikrotitračnej doštičky. Testované vzorky nariadeného ľudského séra sa inkubujú v jamkách mikrotitračnej doštičky. V tejto fáze dochádza k naviazaniu špecifických protilátok z ľudského séra na imobilizovaný antigen. Po inkubácii sa premytím odstráni nezreagované komponenty ľudského séra a pridá sa konjugát chrenovej peroxidázy s protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu IgG. Po inkubácii a odstránení prebytočného konjugátu sa pridá substrát TMB a enzymová reakcia sa zastaví pridaním kyseliny sírovej. Absorbancia testovaných vzoriek sa porovnáva s absorbanciou štandardov. Intenzita sfarbenia je úmerná množstvu špecifických protilátok prítomných v sére.

## ZLOŽENIE

### Nezamietať substancie z iných súprav!

#### 1. Mikrotitračná doštička

12 ks 8-jamkových lámateľných stripov potiahnutých antígenom.

#### 2. Štandardy

6 fľaštičiek, 6 fľaštičiek (6 x 1 ml) s roztokmi špecifickej protilátky IgG proti *Saccharomyces* s koncentraciou 0 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 – 100 U.ml<sup>-1</sup>. Štandardy sú vyriedené v zriedovacom roztoku, pripravené na použitie.

#### 3. Kontrolné vzorky

2 fľaštičky, 1 fľaštička (1 ml) s kontrolnou vzorkou negatívnou a 1 fľaštička (1ml) s kontrolnou vzorkou pozitívnou. Sú vyriedené v zriedovacom roztoku, pripravené na použitie. Koncentrácie sú uvedené v Osvedčení o súprave.

#### 4. Substrát TMB

1 fľaštička (8 ml) s TMB (3,3',5,5'- tetrametylbenzidín). Je pripravený na použitie.

#### 5. Zriedovacie roztok

1 fľaštička (100 ml) s TRIS-HCl tlmivým roztokom s obsahom bovinného sérového albumínu, 0,2%

azidu sodného, 0,02% timerosalu a modrého farbiva, pH 7,0 ± 0,2. Je pripravený na použitie.

#### 6. Vymývacie roztok

1 fľaštička (50 ml). Obsah fľaštičky s vymývacím roztokom doplňte do 1000 ml destilovanou vodou.

#### 7. Konjugát

1 fľaštička (8 ml) s konjugátom HRP-anti-IgG. Je pripravený na použitie.

#### 8. Kyselina sírová

1 fľaštička (8 ml) s roztokom 0,5 mol.l<sup>-1</sup> kyseliny sírovej. Je pripravený na použitie.

## PRÍPRAVA VZORIEK

Súprava je určená na stanovenie vzoriek krvného séra. Čerstvé vzorky sa v priebehu stanovenia uskladňujú do 72 hodín pri 2-8 °C. Vzorky séra sa dlhodobo uskladňujú pri -20°C. Tieto po rozmrazení viackrát nezamrazujte. Na stanovenie nepoužívajte lipemické, hemolyzované alebo kontaminované krvné séra. Pacientske séra sa riedia 1:101, t.j. 10 µl séra sa zriedi prídavkom 1 ml zriedovacieho roztoku.

## DOPORUČENIE PRE PRÁCU SO SÚPRAVOU

- Všetky reagenty musia byť pred začiatkom stanovenia vytemperované na laboratórnu teplotu.
- Všetky inkubácie sa robia pri laboratórnej teplote 18 - 25°C.
- Odporúčame, aby sa štandardy, negatívna, pozitívna vzorka a pacientske séra spracovali v duplikátoch.
- Pracujte s presnými pipetami.
- Zabráňte mechanickému poškodeniu stripov.
- Nepoužitú stripy uchovávajte v obale spolu s vysušovadlom.
- Po ukončení premývania je dôležité dôkladne odstrániť vymývacie roztok zo stripov.

## PRACOVNÝ POSTUP

1. Pipetujte do jamiek stripov:
  - po 100  $\mu$ l štandardov
  - po 100  $\mu$ l negatívnej kontrolnej vzorky
  - po 100  $\mu$ l pozitívnej kontrolnej vzorky
  - po 100  $\mu$ l patientskych zriedených vzoriek
2. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote.
3. Po ukončení inkubácie stripy 4x premyte vymývacím roztokom, pripraveným podľa návodu.

Poznámka: Pokiaľ nie je k dispozícii špeciálna premývačka pre mikrotitračné doštičky, premývanie spočíva v napipetovaní cca. 250  $\mu$ l vymývacieho roztoku do všetkých použitých jamiek. Po 30 sekundách sa vymývací roztok zo stripov prudko vyleje. Postup sa opakuje ešte 3x.

4. Po ukončení premývania mikrotitračnú doštičku otočte hore dnom a okraje osušte filtračným papierom.
5. Do jamiek napipetujte po 100  $\mu$ l konjugátu HRP-anti-IgG a inkubujte pri laboratórnej teplote 30 minút.
6. Stripy znova 4x premyte vymývacím roztokom a osušte podľa bodu 4.
7. Do jamiek napipetujte bez prerušenia po 50  $\mu$ l substrátu TMB. Pipetovanie musí byť ukončené do 2 minút!
8. Vyfarbuje sa 15 min v tme.
9. Reakcia sa zastaví pridaním 50  $\mu$ l kyseliny sírovej do každej jamky.
10. Intenzitu sfarbenia merajte na fotometrickom čítači mikrotitračných doštičiek pri vlnovej dĺžke 450 nm. Ako referenčný filter môže byť použitý filter s vlnovou dĺžkou od 600 – 690 nm. Meranie ukončíte najneskôr do 1 hod po skončení vyvíjania. Doštičku medzitým uschovajte v tme.

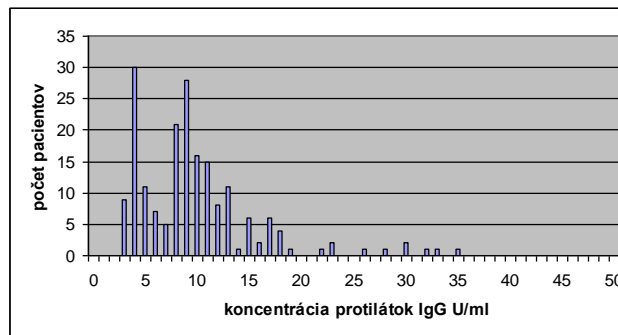
## INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

- Keď nie je k dispozícii program na zostrojenie kalibračnej závislosti, použite nasledovný postup.
- Vypočítajte priemerné absorbancie pre každý štandard, kontrolné a patientske vzorky.
- Nakreslite štandardnú krivku na semilogaritmický papier vynesím logaritmu koncentrácií štandardov ( $\text{U.ml}^{-1}$ ) na horizontálnu (x) os proti priemerným absorbanciam štandardov na vertikálnu (y) os.
- Z krivky odčítajte hodnotu koncentrácií kontrolných a patientskych vzoriek. Táto hodnota sa už nenásobí riediacim faktorom.

## OČAKÁVANÉ HODNOTY

Očakávané hodnoty u zdravej populácie sú negatívne. Avšak, aj u asymptomatických, zjavne zdravých osôb môžu byť zvýšené hladiny protilátok proti *Saccharomyces cerevisiae*.

Hodnoty boli získané na základe stanovenia sér 190 zdravých jedincov. Každé laboratórium by si malo stanoviť vlastné rozpätie normálnych hodnôt na základe klinicky charakterizovaných vzoriek.



Odporúčame nasledovné hodnotenie:

	protilátky IgG
Negatívne hodnoty	< 22 $\text{U.ml}^{-1}$
Hraničná hodnota	22 – 28 $\text{U.ml}^{-1}$
Pozitívne hodnoty	> 28 $\text{U.ml}^{-1}$

## KONTROLA KVALITY STANOVENIA

- Absorbancia nulového štandardu by mala byť menej ako 0,2.
- Absorbancia najvyššieho štandardu by mala byť viac ako 0,8.
- Hodnoty koncentrácií negatívnej a pozitívnej kontrolnej vzorky sa musia pohybovať v intervale koncentrácií uvedenom v Osvedčení o súprave.

## CHARAKTERISTIKA STANOVENIA

### Štandardizácia

Štandardy v súprave ELISA-anti-ASCA-II-G sú kalibrované proti internému referenčnému štandardu.

### Merací rozsah

6,25-100  $\text{U.ml}^{-1}$ .

### Citlivosť

Detekčný limit súpravy je 5  $\text{U.ml}^{-1}$ .

### Špecifita

Súpravou stanovujeme protilátky triedy IgG proti antigénom *Saccharomyces cerevisiae*.

### Recovery

Metódou štandardného prídavku sa získajú hodnoty 80-120%.

## UPOZORNENIE

- Súprava je určená pre profesionálne in vitro použitie v laboratóriu.
- V prípade výskytu nežiaducich príhod, tieto hláste na č. tel. +421 55 6228 131, biogema4@biogema.sk
- Jednotlivé substancie súpravy obsahujú konzervačné činidlá azid sodný a timerosal. Azid sodný reaguje s olovom a meďou za vzniku výbušných azidov. Azid sodný a timerosal môžu pri priamom kontakte s pokožkou spôsobiť podráždenie. V prípade kontaktu s pokožkou postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.
- Kyselina sírová, v koncentrácii 0,5  $\text{mol.l}^{-1}$ , môže pri priamom kontakte s očami alebo pokožkou

spôsobí podráždenie. V prípade zasiahnutia očí alebo kože postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.

- Azid sodný, timerosal a kyselina sírová v koncentráciách, ktoré sú použité v súprave, sú zdraviu škodlivé. Vzhľadom k nízkemu obsahu škodlivých látok v substanciiach súpravy životné prostredie nie je ohrozené.
- Kontrolné vzorky a štandardy obsahujú ľudské sérum. Ľudské sérum použité na prípravu kontrolných vzoriek a štandardov vykazovalo negatívnu reakciu na prítomnosť antigénu HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV. Žiadna metóda stanovenia však nie je schopná dať stopercentnú istotu, preto so substanciami obsahujúcimi ľudské sérum pracujte ako s infekčným materiálom, pri práci používajte rukavice.
- Výrobca ručí za výsledky dosiahnuté ELISA-anti-ASCA-II-G len v prípade dodržiavania návodu a skladovacích podmienok. Reagencie nepoužívajte po uplynutí expiračnej doby.

## LIKVIDÁCIA ODPADU

Nepoužitú zvyšky patientskych vzoriek a substancie obsahujúce ľudské sérum likvidujte ako infekčný materiál, ostatný materiál a nepoužitú zvyšky súpravy obsahujúce nebezpečné chemické látky odporúčame tiež zabezpečiť v súlade s ustanoveniami zákona NR SR č. 223/2001 Z.z. a vyhlášky MŽP SR č. 284/2001 Z.z.

## SKLADOVANIE A STABILITA

Súpravu skladujte pri 2 - 8 °C. Doba expirácie súpravy je 9 mesiacov odo dňa výroby, ak sú substancie v pôvodnom stave. Neodporúčame kombinovať substancie viacerých šarží.

## LITERATÚRA:

Barta,Z., Csípo,I., Szabó,G.G., Szegedi,G.: Seroreactivity against *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and celiac disease. *World J. Gastroenterol.* 2003, 9,(10), 2308-2312

Hoffman,I.E.A., Demetter,P., Peeters,M., De Vos,M., Mielants,H., Veys,E.M., De Keyser,F.: Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies are raised in ankylosing spondylitis and undifferentiated spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2003, 62, 455-459

Lindberg,E., Magnusson,K.E., Tysk,C., Järnerot,G.: Antibody (IgG, IgA, and IgM) to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast mannan, gladin, ovalbumin and betalactoglobulin in monozygotic twins with inflammatory bowel disease. *Gut*, 1992, 33, 909-913

Muratori,P., Muratori,L., Guidi,M., Maccariello,S., Pappas,G., Ferrari,R., Gionchetti,P., Campieri,M., Bianchi,F.B.: Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) and autoimmune liver diseases. *Clin Exp Immunol.* 2003, 132, 473-476

Nevorál,J., Valtrová,V., Kotalová,R., Nyč,O., Bartůňková,J., Tláskal,P.: Protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) a protilátky proti cytoplazmě neutrofilních leukocytů (ANCA) u dětí a mladistvých s nespecifickými zánětlivými střevními onemocněními. *Čes.-slov.Pediat.*, 2003,58, 291-293

Šišinka,M., Nyulassy,Š., Badalík,Z. a kol.: *Vademecum medicí 6.* prepracované, aktualizované, doplnené a rozšírené vydanie. Vydavateľstvo Osveta s.r.o. Martin 2003

EN ISO 9001 v platnom znení	Certifikovaný systém manažérstva kvality	Pozri návod na používanie	Podniková norma
EN ISO 13485 v platnom znení	Certifikovaný systém manažérstva kvality pre zdravotnícke pomôcky	Nepoužívať opakovane	Použiteľné do
CE	Značka zhody so Smernicou Európskeho parlamentu a Rady 98/79/ES a NV SR č. 569/2001 Z.z.	Diagnostická zdravotnícka pomôcka <i>in vitro</i>	Jednorazový obal po použití vyhodit' do príslušnej zbernej nádoby
-2°C	Obmedzenie teploty	Výrobca	Zelený bod
Dátum výroby	Dátum výroby	Kód dávky	Recyklovateľný obal
Chrániť pred slnkom	Chrániť pred slnkom	Katalógové číslo	Varovanie
CONTROL+	Pozitívna kontrola	Obsah postačuje na n skúšok	Štandardy
CONJUGATE	Konjugát HRP	CONTROL-	Kyselina sírová
WASHBUF	Vymývaci roztok	Substrát TMB	Mikrotitračná doštička potiahnutá antigénom
		Zried'ovací roztok	



**BIOGEMA, výrobné družstvo, Košice**

Garbiarska 2, 040 01 Košice, SR

Tel.: +421 55 - 633 6753, 622 5719, 622 8131

e-mail: biogema3@biogema.sk www.biogema.sk



12/2022

**BIOGEMA CZ, s.r.o.**

Šromova 803/1b, 643 00 Brno

Tel.: +420 545 578 255, mobil +420 603 973 047

e-mail: biogema@biogema.cz www.biogema.cz

Distribúcia v ČR



## Odporúčania na spracovanie súprav na ELISA automatoch.

Nastavenie teploty v automatizovanom systéme musí byť zabezpečené tak, aby bolo v súlade s odporúčanou teplotou uvedenou v návodoch pre spracovanie súprav.

Odporúčame zabezpečiť aby substrát v automate nebol vystavený svetlu a aby sa tým eliminovala možnosť jeho znehodnotenia (zmodranie na svetle). Odporúčame mať počas spracovania súpravy zatvorený hlavný kryt automatizovaného systému.

Pre každé spracovanie súpravy použiť a nariediť iba potrebné množstvo čerstvých substancií. Ak už vzniknú prebytky z predchádzajúcich meraní (napr. vymývacieho roztoku, štandardov ...) neodporúčame na ďalšie použitie aj keď boli uskladnené v chlade.

Pred samotným spracovaním v automatizovanom systéme je dôležité dodržať odporúčania ohľadne vytemperovania substancií (vplyv na presnosť merania) a mikrotitračnej platničky (eliminovať možnosť kondenzátu po vybratí z uskladnenia v chlade).

Substancie používať iba v rámci príslušnej šarže a súpravy (nesmú sa miešať substancie medzi rôznymi šaržami)

Odsledovať časový priebeh jednotlivých krokov v rámci spracovania súpravy v automatizovanom systéme či korešponduje s odporúčaným postupom uvedeným v návode (hlavne po fáze premývania by mala byť hneď pridaná príslušná substancia - konjugát, substrát). V prípade nesúladu konzultovať správne programové nastavenia so servisným technikom.

Skontrolovať správny priebeh každého kroku spracovania súpravy v automatizovanom systéme – napr. nevšimnutie si, že sú zlepené prívodné hadičky spôsobí zlé premytie platne.