



IMMCO
DIAGNOSTICS

Anti-Saccharomyces cerevisiae - Antibody (ASCA) IgA and IgG ELISA

IVD

PRODUCT INSERT

REF 1156A Anti-Saccharomyces cerevisiae IgA antibody ELISA 96 Determinations

REF 1156G Anti-Saccharomyces cerevisiae IgG antibody ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and semi-quantitation of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (IgG or IgA) in human serum of patients with inflammatory bowel disorder (IBD) as an aid in the diagnosis of Crohn's disease (CD).

SUMMARY AND EXPLANATION

Inflammatory bowel diseases (UC and CD) are chronic remitting disorders with unpredictable courses and variable responses to therapy. The diagnosis of IBD is based on clinical, radiological, endoscopic and histological findings. Immunological, environmental, infectious (*Yersinia enterocolitica*) and genetic factors have been postulated to increase the risk for developing IBD¹. CD is primarily a disease of older children and young adults and is rare in infancy. Few epidemiological studies have been conducted to find the incidence of CD in the general population. In the Scandinavian population alone, the incidence of IBD is 7 per 100,000, with CD at 1.3 per 100,000². CD can affect any part of the intestine, and the lesions are often patchy and occasionally very extensive. Histologically, CD is characterized by a transmural inflammatory infiltrate composed predominantly of lymphocytes and macrophages. Macrophage aggregates are often seen in biopsy specimens, but well developed granulomas are present in only 50% resected specimens³. The usual surgical procedures for CD include segmental resection and stricturoplasty². CD can also manifest itself along with other disorders like Henoch-Schonlein purpura⁴. Vasculitis is an uncommon complication of CD, however, few cases have been reported of cutaneous polyarteritis nodosa with CD⁴. A milder form of perianal CD exists and can vary from mild asymptomatic disease to a severe disabling disorder⁵. ASCA of IgG and IgA isotype are present in 60% of cases with diagnosed CD¹. The ASCA's are directed against phosphopeptidomannans present in the yeast (*S. cerevisiae*) cell walls⁶. ASCA may be elicited due to molecular mimicry and priming by a high mannose-containing bacterial or viral antigen or an "auto antigenic (self) molecule"^{1,7}. It has been observed that levels of ASCA in CD cases are independent of disease activity, duration and treatment⁸. ASCA occur frequently in CD patients with positive familial history. ASCA are not considered specific markers of genetic susceptibility, but their presence indicates a genetic predisposition⁹. Studies in monozygotic twins and the Jewish population indicates an influence of genetic factors on the pathogenesis of CD¹⁰. The mode of inheritance seems to be complex and heterogenous, with candidate loci of IBD located on chromosomes 2, 6, 12, and 16¹¹. Recently, serological testing algorithms have been proposed for diagnosis of IBD and to improve discrimination between CD and UC¹. In summary, all suspected cases of IBD must be tested for ASCA (IgG and IgA).

PRINCIPALS OF THE PROCEDURE

The ASCA test is performed as a solid phase immunoassay (ELISA). Microwells are coated with *Saccharomyces cerevisiae* phosphopeptidomannan antigen followed by blocking the unreacted sites to reduce nonspecific binding. Controls, calibrators and patient serum samples are incubated in the antigen coated wells which allows ASCA present in the serum to bind. Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Antibodies bound to the microwells are detected by adding enzyme labeled anti-human IgG or IgA conjugates to the wells. These enzyme conjugated antibodies bind specifically to the human immunoglobulin of the appropriate class. Unbound enzyme conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* is detected by a color change produced by the conversion of the pNPP substrate. The reaction is stopped and the intensity of color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in enzyme units per milliliter (EU/ ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell strips are for one time use only.

Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹².

WARNING - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Use good laboratory techniques to minimize microbial and chemical contamination. Do not use after expiration date.

Materials provided

ImmLISA™ Anti-Saccharomyces cerevisiae IgA antibody ELISA [REF](#) 1156A

ImmLISA™ Anti-Saccharomyces cerevisiae IgG antibody ELISA [REF](#) 1156G

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	MICROPLATE ASCA	Microplate with individual breakaway microwells coated with <i>S. cerevisiae</i> phosphopeptidomannan.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A ASCA *†	Ready to use Calibrator A (<i>green cap</i>). Human serum containing antibodies to ASCA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B ASCA *†	Ready to use Calibrator B (<i>violet cap</i>). Human serum containing antibodies to ASCA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C ASCA *†	Ready to use Calibrator C (<i>blue cap</i>). Human serum containing antibodies to ASCA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D ASCA *†	Ready to use Calibrator D (<i>yellow cap</i>). Human serum containing antibodies to ASCA.
1 x 1.5 ml	CONTROL + ASCA *†	Ready to use Positive Control (<i>red cap</i>). Contains human serum positive for ASCA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use Negative Control (<i>white cap</i>). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS *†	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL *	Ready to use Serum Diluent . Color coded blue.

EN

1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light.
1 x 12 ml	STOP	Ready to use Stop Solution .
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.

* Contains < 0.1% NaN₃

† **REF** 1156A contains IgA-ASCA calibrators, controls and IgA conjugate

REF 1156G contains IgG-ASCA calibrators, controls and IgG conjugate

Symbols used on labels:

LOT Lot number


REF Catalog number

 Use by

 Storage temperature

 Read instructions for use

IVD In vitro diagnostic use

 Manufacturer

 Number of Tests

Materials Required But Not Provided

- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Deionized or distilled water
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Timer
- Absorbent paper
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Procedural Notes

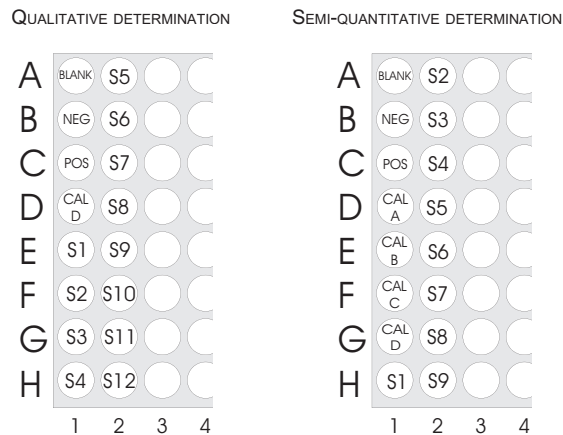
- Before starting the assay read these instructions carefully.
- Bring all reagents and samples to room temperature (20-26°C) for 30 minutes. Return materials to refrigerator immediately after use.

EN

- Prepare all dilutions of the patient specimens before starting the test.
- **Immediately return unused strips to the pouch containing desiccants and seal securely to minimize exposure to water vapor.**
- Wash step: Good technique is critical. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- Careful timing is important. Incubation periods begin after dispensing reagents.

Assay procedure

1. **ALL REAGENTS MUST BE BROUGHT TO ROOM TEMPERATURE (20-26°C) PRIOR TO BEGINNING THE ASSAY.**
2. Label protocol record to indicate specimen placement in the microplate. It is good laboratory practice to test specimens in duplicate.
3. **Qualitative determination:** use only Calibrator D.
Semi-quantitative determination: use Calibrators A - D as shown in the example below.



4. Prepare a **1:51** dilution of the patient specimen by mixing **10 µl** of the patient specimen with **0.5 ml** of Serum Diluent.
5. Add **100 µl** of Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient specimens to the appropriate microwells indicated on the protocol record.
Note: Include one well with **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank. The absorbance of this well should not be greater than 0.3.
6. Incubate **30 minutes** (\pm 5 minutes) at room temperature on a level surface.
7. Wash step: Thoroughly aspirate the contents of each well. Add 200-300µL of the **reconstituted** wash buffer to all wells then aspirate. Repeat this sequence thrice more for a total of four washes. Invert the plate and tap it on absorbent material to remove any residual fluid after the last wash. Do not dry wells completely.
8. Add 100µL of the Conjugate to each well.
9. Incubate the wells for **30 minutes** (\pm 5 minutes) at room temperature.
10. Wash step: Repeat step 7.
11. Add 100µL of Enzyme Substrate to each well.
12. Incubate for **30 minutes** (\pm 5 minutes) at room temperature.

EN

13. Add 100µL of Stop Solution to each well. Maintain the same sequence and timing of Stop Solution addition as was used for the Enzyme Substrate. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm within one hour of stopping the reaction.
14. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm using a single or dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <20 EU/ml. If the test is run in duplicate, take the mean of the two readings to determine the EU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations, the positive control must give values in the range stated on the vial.

Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{EU/ml of Calibrator D} = \text{EU/ml Test Sample}$$

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit linear curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.

Calibrator

The ready to use calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such serum sample should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor. Sample standard curves appear at the end of this document.

Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. The values depicted below were determined by testing 64 normal blood donors and represent the mean of the normals plus 3SD. Each laboratory must determine its own normal values.

ASCA Values EU/ml	Interpretation
IgA or IgG < 20	Negative
IgA or IgG 20-25	Borderline
IgA or IgG > 25	Positive

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The ImmuLisa™ Test should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated, lipemic or icteric samples. The method should be used for testing human serum samples only. Testing for both isotypes of ASCA is strongly recommended. Testing for only one and not both may lead to false negative results. A negative ASCA

result does not rule out the presence of Crohn's disease. A negative ASCA antibody result does not rule out the presence of ASCA antibodies, because the concentration of antibody may be below the detection limit of the assay. Furthermore, a diagnosis cannot be made on the basis of ASCA results alone. The results of other laboratory tests and clinical findings must also be considered. The presence of immune complexes or other immunoglobulin aggregates in the patient sample may cause an increased level of non-specific binding and produce false positives in this assay. ASCA also occur in patients with UC, their first degree relatives and mixed families with CD and UC^{3,9}. They are also present to a lesser extent in some other autoimmune diseases¹³. Assay performance has not been established for pediatric CD and UC patients.

EXPECTED VALUES

The expected values in a normal population are negative (<20 EU/ml). However, it has been determined that some apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive for IgA or IgG ASCA antibodies⁹. Combined evaluation of ASCA and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody (pANCA) for all suspected cases of IBD is suggested, to increase the positive predictive value in comparison to individual assessment of CD cases by ASCA and UC cases by pANCA^{14,15}. See Tables I and II at the end of this document.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Samples from patients with clinical diagnosis of CD (30 specimens) and UC (30 specimens) were tested along with normal human sera (6 specimens). Results obtained with the ImmuLisa™ anti-ASCA ELISA assays follow:

		ImmuLisa™ ASCA-IgA		
		Positive	Negative	Total
Disease Diagnosis	CD	12	18	30
	Other	0	36	36
	Total	12	54	66
		Sensitivity: 40%		Specificity: 100%

		ImmuLisa™ ASCA-IgG		
		Positive	Negative	Total
Disease Diagnosis	CD	18	12	30
	Other	6	31	36
	Total	23	43	66
		Sensitivity: 60%		Specificity: 86%

The same sample set was used in a comparative evaluation of the ASCA ImmuLisa™ (IgG and IgA) against another commercially-available ASCA ELISA. Results are depicted in table III at the end of this document.

Cross Reactivity Study:

Sera from patients suffering from various conditions and individuals positive for certain autoantibodies were tested for ASCA with the ImmuLisa™ assay. Results appear in table IV at the end of this document.

Precision:

In ten replicates, three different ASCA positive sera were tested with the ImmuLisa™ to determine the intra-assay variation, and three positive sera were tested to determine the inter-assay variation. The results appear in table V at the end of this document.

EN

Reportable Range:

Four ASCA positive samples were tested with the Immulisa™ to determine precision at even intervals through the reportable range of the assays. The results appear in table VI at the end of this document.

Recovery:

Samples with known ASCA concentrations were mixed with appropriate dilutions of another positive sample with known amounts of ASCA. ASCA levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery calculated. The results appear in table VII at the end of this document.

Clinical Studies:

39 diagnosed Crohn's disease cases, 38 Ulcerative colitis cases and 12 cases with unrelated gastrointestinal disturbances were tested both on Immulisa™ ASCA IgG and IgA. Results are depicted in table VIII at the end of this document.



Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgA και IgG κατά του *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1156A Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgA κατά του *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) 96 προσδιορισμοί

REF 1156G Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgG κατά του *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) 96 προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων (IgG ή IgA) κατά του *Saccharomyces cerevisiae* σε ορό ανθρώπου ασθενών που πάσχουν από φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (ΦΝΕ), ως βοήθημα για τη διάγνωση της νόσου του Crohn (NK).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου [ελκώδης κολίτιδα (ΕΚ) και νόσος του Crohn (NK)] είναι χρόνιες διαλείπουσες διαταραχές με απρόβλεπτη πορεία και ποικίλη ανταπόκριση στη θεραπεία. Η διάγνωση των ΦΝΕ βασίζεται στα κλινικά, ακτινολογικά, ενδοσκοπικά και ιστολογικά ευρήματα. Αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης ΦΝΕ έχει θεωρηθεί ότι προκαλούν ανοσολογικοί, περιβαλλοντικοί, λοιμογόνοι (*Yersinia enterocolitica*) και γενετικοί παράγοντες¹.

Η NK είναι κυρίως νόσος των μεγαλύτερων παιδιών και των νεαρών ενηλίκων, ενώ είναι σπάνια στη βρεφική ηλικία. Λίγες επιδημιολογικές μελέτες έχουν διεξαχθεί για την ανεύρεση της επίπτωσης της NK στο γενικό πληθυσμό. Μόνο στο Σκανδιναβικό πληθυσμό, η επίπτωση των ΦΝΕ είναι 7 ανά 100.000, με την NK σε επίπεδο 1,3 ανά 100.000². Η NK μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε τμήμα του εντέρου, ενώ οι βλάβες συχνά εμφανίζουν ανομοιομορφία και περιστασιακά λαμβάνουν πολύ μεγάλη έκταση. Ιστολογικά, η NK χαρακτηρίζεται από διατοχωματική φλεγμονώδη διήθηση που αποτελείται κυρίως από λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Σε βιοψίες δειγμάτων εμφανίζονται συχνά συσσωματώματα μακροφάγων, αλλά μόνο στο 50% των διατετημένων δειγμάτων ανευρίσκονται πλήρως ανεπτυγμένα κοκκιώματα³. Οι συνήθεις χειρουργικές επεμβάσεις για την NK περιλαμβάνουν τμηματική διατομή και πλαστική αποκατάσταση των στενώσεων². Η NK μπορεί επίσης να εκδηλωθεί στα πλαίσια άλλων νοσημάτων, όπως είναι η πορφύρα Henoch-Schonlein⁴. Η αγγειίτιδα είναι μια ασυνήθιστη επιπλοκή της NK, ωστόσο έχουν αναφερθεί κάποιες περιπτώσεις δερματικής οζώδους πολυαρτηρίτιδας με NK⁴. Υπάρχει μια ηπιότερη μορφή περιπρωκτικής NK, η οποία μπορεί να ποικίλλει από ήπια ασυμπτωματική νόσο μέχρι σοβαρή διαταραχή που προκαλεί αναπηρία⁵.

Αντισώματα ASCA των ισότύπων IgG και IgA ανευρίσκονται στο 60% των διαγνωσμένων περιπτώσεων NK¹. Τα ASCA στρέφονται κατά των φωσφοπεπτιδομαννάνων που ανευρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμομυκήτων (*S. cerevisiae*)⁶. Τα ASCA ενδέχεται να εμφανίζονται λόγω μοριακού μιμητισμού και ενεργοποίησης από ένα βακτηριακό ή ιικό αντιγόνο υψηλής περιεκτικότητας σε μαννόζη, ή από ένα "αυτο-αντιγονικό μόριο"^{1,7}. Έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα ASCA στις περιπτώσεις NK δεν εξαρτώνται από τη δραστηριότητα της νόσου, τη διάρκεια και τη θεραπεία⁸.

Τα ASCA εμφανίζονται συχνά σε ασθενείς με NK που έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό. Τα ASCA δεν θεωρούνται ειδικοί δείκτες γενετικής ευπάθειας, αλλά η παρουσία τους υποδηλώνει κάποια γενετική προδιάθεση⁹. Μελέτες σε μονοζυγωτικά δίδυμα και στον Εβραϊκό πληθυσμό υποδεικνύουν την επίδραση γενετικών παραγόντων στην παθογένεση της NK¹⁰. Ο τρόπος με τον οποίο κληρονομείται φαίνεται να είναι πολύπλοκος και ετερογενής, ενώ οι υποψήφιοι γενετικοί τόποι των ΦΝΕ εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 2, 6, 12 και 16¹¹.

Πρόσφατα, έχουν προταθεί αλγόριθμοι ορολογικών εξετάσεων για τη διάγνωση των ΦΝΕ και την καλύτερη διάκριση μεταξύ NK και ΕΚ¹. Συνοψίζοντας, όλες οι ύποπτες περιπτώσεις ΦΝΕ θα πρέπει να εξετάζονται για ASCA (IgG και IgA).

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση αντισωμάτων ASCA διενεργείται ως ανοσοπροσδιορισμός στερεάς φάσης (ELISA). Οι μικροκυψελίδες επικαλύπτονται με αντιγόνο φωσφοπεπτιδομαννάνης του *Saccharomyces cerevisiae* και, στη συνέχεια, τα σημεία που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου,

EL

οι βαθμονομητές και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση των αντισωμάτων ASCA του ορού. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν στις μικροκυψελίδες ανιχνεύονται με την προσθήκη στις κυψελίδες σηματομένου με ένζυμο συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης IgG ή IgA. Αυτά τα συζευγμένα με ένζυμο αντισώματα δεσμεύονται ειδικά στην ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη της αντίστοιχης τάξης. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα με το ένζυμο απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες ειδικό ενζυμικό υπόστρωμα (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων κατά του *Saccharomyces cerevisiae* με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος pNPP. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται με φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ενζύμου ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.** Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

Προφυλάξεις

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έκχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹². ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc.

Να χρησιμοποιείτε τις ορθές εργαστηριακές τεχνικές προκειμένου να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος μικροβιακής και χημικής μόλυνσης. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgA κατά του *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) ImmuLisa™ [REF](#) 1156A

Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgG κατά του *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) ImmuLisa™ [REF](#) 1156G

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8

MICROPLATE | **ASCA**

Πλακίδιο ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με φωσφοπεπτιδομαννάνη του *S. cerevisiae*.

1 x 1,5 ml

CALIBRATOR | **A** | **ASCA** *†

Έτοιμος προς χρήση **Βαθμονομητής A** (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του ASCA.

1 x 1,5 ml

CALIBRATOR | **B** | **ASCA** *†

Έτοιμος προς χρήση **Βαθμονομητής B** (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του ASCA.

EL

1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C ASCA *†	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής C (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D ASCA *†	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής D (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του ASCA.
1 x 1,5 ml	CONTROL + ASCA *†	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για αντισώματα ASCA.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα αρνητικού ελέγχου (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS *†	Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	DIL *	Έτοιμο προς χρήση αραιωτικό διάλυμα ορού . Χρώματος μπλε.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Έτοιμο προς χρήση ενζυμικό υπόστρωμα . Περιέχει p-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). Να προστατεύεται από το φως .
1 x 12 ml	STOP	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα τερματισμού .
2 x	BUF WASH	Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

* Περιέχει < 0,1% NaN₃

† **REF** Το kit 1156A περιλαμβάνει IgA-ASCA βαθμονομητές, διαλύματα ελέγχου και συζευκτικό αντίσωμα κατά της IgA

REF Το kit 1156G περιλαμβάνει IgG-ASCA βαθμονομητές, διαλύματα ελέγχου και συζευκτικό αντίσωμα κατά της IgG

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT Αριθμός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου

 Ημερομηνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

IVD In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα

πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.

- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικό χαρτί
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για πιο μακροχρόνια φύλαξη τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις της διαδικασίας

- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση διαβάστε προσεκτικά αυτές τις οδηγίες.
- Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-26°C) επί 30 λεπτά. Επιστρέψτε τα υλικά στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Προετοιμάστε όλες τις αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών προτού ξεκινήσετε την ανάλυση.
- **Επιστρέψτε αμέσως τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες στη θήκη με τα αποξηραντικά και σφραγίστε την ασφαλώς, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η έκθεση σε υδρατμούς.**
- Στάδιο έκπλυσης: είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής. **Συνιστάται η χρήση αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό, επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Η προσεκτική τήρηση των χρόνων είναι σημαντική. Οι περίοδοι επώασης ξεκινούν μετά τη χορήγηση των αντιδραστηρίων.

Διαδικασία της μεθόδου

1. **ΟΛΑ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΦΤΑΣΟΥΝ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ (20-26°C) ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.**
2. Σημάνετε το αρχείο πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στο πλακίδιο. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.
3. **Ποιοτικός προσδιορισμός:** χρησιμοποιήστε μόνο το Βαθμονομητή D. **Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός:** χρησιμοποιήστε τους Βαθμονομητές A – D, όπως φαίνεται στο παρακάτω παράδειγμα.

	Ποιοτικός Προσδιορισμός				Ημι-Ποσοτικός Προσδιορισμός			
A	BLANK	S5			BLANK	S2		
B	NEG	S6			NEG	S3		
C	POS	S7			POS	S4		
D	CAL D	S8			CAL A	S5		
E	S1	S9			CAL B	S6		
F	S2	S10			CAL C	S7		
G	S3	S11			CAL D	S8		
H	S4	S12			S1	S9		
	1	2	3	4	1	2	3	4

EL

4. Προετοιμάστε μια αραιώση του δείγματος ασθενούς σε αναλογία **1:51** αναμιγνύοντας **10 µl** του δείγματος του ασθενούς με **0,5 ml** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
5. Προσθέστε **100 µl** βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενούς στις κατάλληλες μικροκυψελίδες που υποδεικνύονται στο αρχείο του πρωτοκόλλου.
Σημείωση: Συμπεριλάβετε μία κυψελίδα με **100 µl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου. Η απορρόφηση αυτής της κυψελίδας δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,3.
6. Επώαστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου, επάνω σε μια επίπεδη επιφάνεια.
7. Στάδιο έκπλυσης: Αναρροφήστε σχολαστικά το περιεχόμενο κάθε κυψελίδας. Προσθέστε 200-300µL του **ανασυσταθέντος** ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και έπειτα αναρροφήστε το. Επαναλάβετε αυτή την ακολουθία ενεργειών άλλες τρεις φορές, ώστε να πραγματοποιηθεί ένα σύνολο τεσσάρων εκπλύσεων. Αναστρέψτε το πλακίδιο και κτυπήστε το ελαφρά επάνω σε ένα απορροφητικό υλικό ώστε να απομακρυνθεί τυχόν υπολειπόμενο υγρό από την τελευταία έκπλυση. Μην αποξηραίνετε πλήρως τις κυψελίδες.
8. Προσθέστε 100 µL συζευκτικού αντισώματος σε κάθε κυψελίδα.
9. Επώαστε τις κυψελίδες επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Στάδιο έκπλυσης: Επαναλάβετε το στάδιο 7.
11. Προσθέστε 100 µL ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα.
12. Επώαστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Προσθέστε 100 µL διαλύματος τερματισμού σε κάθε κυψελίδα. Διατηρήστε την ίδια σειρά και τους ίδιους χρόνους στην προσθήκη διαλύματος τερματισμού, όπως και στην προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου. Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος 405 nm, εντός μιας ώρας από τον τερματισμό της αντίδρασης.
14. Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος 405 nm, χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι $<0,3$. Ο Βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή <20 EU/ml. Εάν η εξέταση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων του ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

$$\frac{\text{Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος}}{\text{Απ/ση του Βαθμονομητή D}} \times \text{EU/ml του βαθμονομητή D} = \text{EU/ml εξεταζόμενου δείγματος}$$

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών Α έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε EU/ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησής τους.

Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή Α. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν επί το συντελεστή αραιώσης. Βλ. πρότυπες καμπύλες δειγμάτων (Εικόνα 1) στο τέλος αυτού του εντύπου.

Ερμηνεία

Τα παρακάτω παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Οι τιμές που απεικονίζονται παρακάτω προσδιορίστηκαν με την εξέταση 64 φυσιολογικών αιμοδοτών και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των φυσιολογικών συν 3 τυπικές αποκλίσεις. Κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

Τιμές ASCA EU/ml	Ερμηνεία
IgA ή IgG < 20	Αρνητικό
IgA ή IgG 20-25	Οριακό
IgA ή IgG > 25	Θετικό

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση αντισωμάτων Immulisa™ δεν θα πρέπει να εκτελείται σε δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, σε μολυσμένα από μικρόβια, λιπαιμικά ή ικτερικά δείγματα. Η μέθοδος θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για την εξέταση δειγμάτων ορού ανθρώπου. Συνιστάται ιδιαίτερα η εξέταση και για τους δύο ισότυπους αντισωμάτων ASCA. Η εξέταση μόνο για έναν και όχι και για τους δύο ενδέχεται να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα για ASCA δεν αποκλείει την παρουσία νόσου του Crohn. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα για αντισώματα ASCA δεν αποκλείει τη ύπαρξη αντισωμάτων ASCA επειδή η συγκέντρωση των αντισωμάτων ενδέχεται να είναι χαμηλότερη από το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης. Επιπλέον, η διάγνωση δεν μπορεί να τεθεί μόνο με τα αποτελέσματα των αντισωμάτων ASCA. Θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τα αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών εξετάσεων και τα κλινικά ευρήματα. Η παρουσία ανοσοσυμπλεγμάτων ή άλλων συσσωματωμάτων ανοσοσφαιρινών στο δείγμα του ασθενούς ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένο ποσοστό μη ειδικής δέσμευσης και να δώσει ψευδή αποτελέσματα στην ανάλυση αυτή. Αντισώματα ASCA εμφανίζονται επίσης σε ασθενείς με ΕΚ, στους πρώτου βαθμού συγγενείς τους και σε μεικτές οικογένειες με ΝΚ και ΕΚ^{3,9}. Εμφανίζονται επίσης σε μικρότερο βαθμό και σε κάποια άλλα αυτοάνοσα νοσήματα¹³. Η απόδοση της ανάλυσης δεν έχει τεκμηριωθεί για παιδιατρικούς ασθενείς με ΝΚ και ΕΚ.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Οι αναμενόμενες τιμές σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρνητικές (<20 EU/ml). Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι ορισμένα ασυμπτωματικά, φαινομενικά υγιή άτομα, ενδέχεται να βρεθούν θετικά σε IgA ή IgG αντισώματα ASCA⁹. Συνιστάται συνδυασμός αξιολόγησης των αντισωμάτων ASCA και των περιπυρηνικών αντιουδετεροφιλικών κυτταροπλασματικών αντισωμάτων (pANCA) σε όλες τις περιπτώσεις όπου υπάρχει υποψία ΦΝΕ, προκειμένου να αυξηθεί η θετική διαγνωστική αξία σε σύγκριση με τη μεμονωμένη αξιολόγηση των περιπτώσεων ΝΚ μέσω αντισωμάτων ASCA και των περιπτώσεων ΕΚ μέσω αντισωμάτων pANCA^{14, 15}. Βλ. πίνακες I και II στο τέλος αυτού του εντύπου.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Εξετάστηκαν δείγματα από ασθενείς με κλινική διάγνωση NK (30 δείγματα) και EK (30 δείγματα) μαζί με φυσιολογικούς ορούς ανθρώπου (6 δείγματα). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη μέθοδο ELISA για αντισώματα κατά του ASCA ImmuLisa™ είναι τα παρακάτω:

		ImmuLisa™ ASCA-IgA		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
Διάγνωση νόσου	NK	12	18	30
	Άλλο	0	36	36
	Σύνολο	12	54	66
		Ευαισθησία: 40%	Ειδικότητα: 100%	

		ImmuLisa™ ASCA-IgG		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
Διάγνωση νόσου	NK	18	12	30
	Άλλο	6	31	36
	Σύνολο	23	43	66
		Ευαισθησία: 60%	Ειδικότητα: 86%	

Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σετ δείγματος σε μια συγκριτική αξιολόγηση της ανάλυσης ASCA ImmuLisa™ (IgG και IgA) έναντι μιας άλλης ανάλυσης αντισωμάτων ASCA με μέθοδο ELISA που διατίθεται στο εμπόριο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα III στο τέλος αυτού του εντύπου.

Μελέτη διασταυρούμενης αντίδρασης:

Οι οροί ασθενών που έπασχαν από διάφορα νοσήματα και ατόμων θετικών για ορισμένα αυτοαντισώματα εξετάστηκαν για αντισώματα ASCA με τη μέθοδο ImmuLisa™. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα IV στο τέλος αυτού του εντύπου.

Ακρίβεια:

Σε δέκα επαναλήψεις, εξετάστηκαν τρεις διαφορετικοί οροί που ήταν θετικοί για ASCA με τη μέθοδο ImmuLisa™ για να προσδιοριστεί η ποικιλότητα εντός σειράς και τρεις θετικοί οροί εξετάστηκαν για να προσδιοριστεί η ποικιλότητα μεταξύ σειρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα V στο τέλος αυτού του εντύπου.

Αναφερόμενο εύρος:

Τέσσερις οροί θετικοί στα αντισώματα ASCA αναλύθηκαν με το kit ImmuLisa™ προκειμένου να προσδιοριστεί η ακρίβεια σε ίσα χρονικά διαστήματα για το αναφερόμενο εύρος των αναλύσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα VI στο τέλος αυτού του εντύπου.

Ανάκτηση:

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων ASCA αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις ενός άλλου θετικού δείγματος που περιείχε γνωστές ποσότητες αντισωμάτων ASCA. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα αντισωμάτων ASCA των αναμειχθέντων δειγμάτων και από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η επί τοις εκατό ανάκτηση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα VII στο τέλος αυτού του εντύπου.

Κλινικές μελέτες:

Εξετάστηκαν 39 διαγνωσμένα περιστατικά με νόσο του Crohn, 38 περιστατικά με ελκώδη κολίτιδα και 12 περιστατικά με μη σχετιζόμενες γαστρεντερικές διαταραχές, τόσο για IgG όσο και για IgA αντισώματα ASCA με τη μέθοδο ImmuLisa™. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα VIII στο τέλος αυτού του εντύπου.



IMMCO
DIAGNOSTICS

Ensayo ELISA para anticuerpos anti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) IgA e IgG

IVD

PROSPECTO

REF 1156A ELISA para anticuerpos anti *Saccharomyces cerevisiae* IgA 96 análisis

REF 1156G ELISA para anticuerpos anti *Saccharomyces cerevisiae* IgG 96 análisis

USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección y semicuantificación de anticuerpos anti *Saccharomyces cerevisiae* (IgG o IgA) en suero humano de pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino y como ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Crohn (EC).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las enfermedades inflamatorias del intestino (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) son trastornos crónicos remitentes con curso impredecible y respuestas variables a la terapia. El diagnóstico de una dolencia inflamatoria intestinal se basa en estudios clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos. Se considera que hay factores inmunológicos, medioambientales, infecciosos (tales como *Yersinia enterocolitica*) y genéticos que aumentan el riesgo de desarrollar esta enfermedad¹. La enfermedad de Crohn se presenta sobre todo en niños mayores y adultos jóvenes, siendo rara en la infancia. Se han efectuado unos pocos estudios epidemiológicos para establecer la incidencia de la EC en la población general. Tan sólo en la población escandinava, la incidencia de enfermedades inflamatorias del intestino es de 7 por 100.000, donde la enfermedad de Crohn representa el 1,3 por 100.000.² Esta dolencia puede afectar a cualquier parte del intestino; las lesiones son irregulares y a veces muy extendidas. Histológicamente, la EC se caracteriza por una infiltración inflamatoria transmural compuesta principalmente por linfocitos y macrófagos. Con frecuencia, en las biopsias se observan agregados de macrófagos, aunque los granulomas bien desarrollados están presentes sólo en el 50% de las muestras analizadas³. Los procedimientos quirúrgicos habituales en la EC incluyen la resección de segmentos y la estricturoplastia². La EC puede manifestarse con otros trastornos, por ejemplo la púrpura de Henoch-Schonlein⁴. La vasculitis es una complicación no común de la EC, si bien se ha informado de algunos casos de poliarteritis nodosa cutánea con EC⁴. Existe una forma más leve de EC perianal, que oscila entre un leve trastorno asintomático hasta una dolencia gravemente invalidante⁵. Los anticuerpos ASCA de isotipo IgG e IgA están presentes en el 60% de los casos de diagnóstico de EC¹. Los ASCA están dirigidos contra los fosfopeptidomananos presentes en la pared celular de una levadura (*S. cerevisiae*)⁶; pueden ser desencadenados por mimetismo molecular y preparación mediante un antígeno bacteriano o viral con alto contenido de manosa, o bien una "molécula auto antigénica"^{1,7}. Se ha comprobado que los niveles de ASCA en los casos de EC son independientes de la actividad de la enfermedad, de su duración y también del tratamiento⁸. Los anticuerpos ASCA con frecuencia están presentes en pacientes que padecen EC con historia familiar positiva. Estos anticuerpos no se consideran marcadores específicos de susceptibilidad genética, pero su presencia indica una predisposición genética⁹. Estudios realizados en gemelos monocigotos y en la población judía indican una influencia de factores genéticos en la patogénesis de la enfermedad de Crohn¹⁰. Los mecanismos de la hereditariadad parecen ser complejos y heterogéneos, localizándose el posible locus candidato para EII en los cromosomas 2, 6, 12, y 16¹¹. Recientemente se han propuesto algoritmos de análisis serológicos para diagnosticar EII y mejorar la diferenciación entre enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa¹. En resumen, todos los casos en que se sospeche la presencia de EII deben ser sometidos a análisis de detección de ASCA (IgG e IgA).

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Inmunoensayo de fase sólida (ELISA). Los pocillos se recubren con antígeno de fosfopeptidomanano *Saccharomyces cerevisiae*; a continuación se bloquean los puntos que no han reaccionado para reducir las uniones no específicas. Se incuban los controles, calibradores y muestras de suero del paciente en los pocillos recubiertos de antígeno, permitiendo que los ASCA presentes en el suero se unan. Los anticuerpos que no se han unido y demás proteínas séricas se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se detectan añadiendo un conjugado de IgG, IgA o IgM antihumano marcado con un enzima a los pocillos. Estos anticuerpos conjugados con enzima se ligan específicamente a la inmunoglobulina humana de la clase respectiva. Después de eliminar

por lavado todo el conjugado que no se hubiera unido, se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP); la presencia de anticuerpos anti *Saccharomyces cerevisiae* es revelada por un cambio de color producido por la conversión del sustrato pNPP. Una vez detenida la reacción enzimática, mediante espectrofotómetro a 405 nm se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración del anticuerpo. Los resultados se expresan en unidades enzimáticas por mililitro (EU/ ml).

REACTIVOS

CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.** No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C). Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tampón de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

Precauciones

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales¹².

ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN₃) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto. No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc.

Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

Material suministrado

ELISA para anticuerpos anti *Saccharomyces cerevisiae* IgA ImmuLisa™ REF 1156A

ELISA para anticuerpos anti *Saccharomyces cerevisiae* IgG ImmuLisa™ REF 1156G

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis

12 x 8	MICROPLATE ASCA	Micropalca con micropocillos individuales separables recubiertos con fosfopeptidomanano de <i>S. cerevisiae</i> .
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A ASCA *†	Calibrador A listo para usar (<i>tapa verde</i>). Suero humano con anticuerpos anti ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B ASCA *†	Calibrador B listo para usar (<i>tapa morada</i>). Suero humano con anticuerpos anti ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C ASCA *†	Calibrador C listo para usar (<i>tapa azul</i>). Suero humano con anticuerpos anti ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D ASCA *†	Calibrador D listo para usar (<i>tapa amarilla</i>). Suero humano con anticuerpos anti ASCA.
1 x 1,5 ml	CONTROL + ASCA *†	Control positivo listo para usar (<i>tapa roja</i>). Contiene suero humano positivo a ASCA.

ES

1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Control negativo listo para usar (<i>tapa blanca</i>). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS *†	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de suero listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático listo para usar. Contiene pNPP. Protégase de la luz.
1 x 12 ml	STOP	Solución Stop lista para usar.
2 x	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro.

* Contiene < 0.1% NaN₃

† **REF** 1156A contiene calibradores ASCA IgA, controles y conjugado IgA


REF 1156G contiene calibradores ASCA IgG, controles y conjugado IgG

Símbolos utilizados en las etiquetas:

LOT Número de lote

REF Número de catálogo

 Fecha de caducidad

 Temperatura de conservación

 Léanse las instrucciones de uso

IVD Para diagnóstico *in vitro*

 Fabricante

 Número de análisis

Materiales necesarios no suministrados

- Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Agua desionizada o destilada
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lavador automático de microplacas con capacidad de 200 µl

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO

Advertencias preliminares

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente (20-26°C) por 30 minutos. Vuelva a poner los materiales en la nevera inmediatamente después de su uso.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- **Guarde inmediatamente en el sobre con sustancias desecantes las tiras que no utilice; ciérrelo herméticamente para reducir al mínimo la exposición al vapor de agua.**
- Fase de lavado: la buena técnica es crucial. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.

Procedimiento del ensayo

1. **LOS REACTIVOS DEBEN ESTAR A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) ANTES DE DAR COMIENZO AL ENSAYO.**
2. Señale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado..
3. **Determinación cualitativa:** use únicamente el Calibrador D. **Determinación semi cuantitativa:** use los Calibradores A - D como se muestra en el ejemplo siguiente.

DETERMINACIÓN CUALITATIVA

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

4. Prepare una dilución de **1:51** de la muestra del paciente mezclando **10 µl** de la muestra con **0.5 ml** de diluyente de suero.
5. Añada **100 µl** de Calibradores, Controles Positivo y Negativo y muestras diluidas del paciente en los respectivos pocillos indicados en la hoja de protocolo.
Nota: Incluya un pocillo con **100 µl** de Diluyente de Suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo. La absorbancia de este pocillo no debe ser superior a 0,3.

ES

6. Incube **30 minutos** (± 5 minutos) a temperatura ambiente sobre una superficie plana.
7. Fase de lavado: aspire totalmente el contenido de cada pocillo. Añada 200-300 μ L de tampón de lavado reconstituido en todos los pocillos y aspire. Repita el procedimiento tres veces más hasta completar cuatro lavados. Después del último lavado, invierta la placa y sacúdala sobre material absorbente para eliminar todo residuo de líquido. No seque completamente los pocillos.
8. Añada 100 μ L de Conjugado en cada pocillo.
9. Incube los pocillos durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
10. Fase de lavado: repita el punto 7.
11. Añada 100 μ L de Substrato enzimático en cada pocillo.
12. Incube durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
13. Añada 100 μ L de Solución Stop en cada pocillo. Mantenga la misma secuencia y tiempos de Solución Stop utilizados para el Substrato enzimático. Lea la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405nm en el plazo de una hora después de haber detenido la reacción.
14. Lea la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405nm mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble comparándolo con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar Calibradores, controles Positivo y Negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser $<0,3$. La lectura de absorbancia del Calibrador A no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <20 EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de ambas lecturas para determinar las EU/ml. Cuando se efectúan determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

Cálculo

Las concentraciones en la muestra del paciente se pueden determinar mediante dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. de muestra analizada

Abs. de Calibrador D X U/ml de Calibrador D = U/ml muestra analizada

Abs. de Calibrador D

2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los Calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en U/ml en el eje X en relación a la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.

Calibrador

Los calibradores proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del Calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar U/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución. Véanse los modelos de curvas estándar al final de este documento.

Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Los valores indicados más abajo se determinaron analizando 64 muestras de donantes de sangre normales

y representan la media de los valores normales más 3 DS. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales.

Valores ASCA EU/ml	Interpretación
IgA o IgG < 20	Negativo
IgA o IgG 20-25	Incierto (valores límite)
IgA r IgG > 25	Positivo

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo ACA ImmuLisa™ no debe efectuarse en muestras muy hemolizadas, contaminadas por microbios o lipémicas. Este método debe utilizarse únicamente para analizar muestras de suero humano. Se recomienda efectuar el análisis de ambos isotipos de ASCA. Analizar un solo isotipo y no los dos puede llevar a resultados falsamente negativos. Un resultado negativo a ASCA no excluye la presencia de la enfermedad de Crohn. Un resultado negativo a ASCA no excluye la presencia de anticuerpos ASCA, porque la concentración de anticuerpos podría estar por debajo del límite de detección del ensayo. Además, la diagnosis no puede basarse solamente en los resultados de ASCA, sino que es necesario tomar en cuenta los resultados de otros análisis de laboratorio y estudios clínicos. La presencia de complejos inmunes de otros agregados de inmunoglobulinas en la muestra analizada puede provocar un aumento en el nivel de las uniones no específicas y dar resultados falsamente positivos. Los pacientes con colitis ulcerosa también presentan ASCA, así como sus familiares de primer grado y en familias mixtas con EC y CU^{3,9}. También están presentes, aunque en menor escala, en otras enfermedades autoinmunes¹³. Las características de rendimiento no se establecieron para niños con EC y CU.

VALORES ESPERADOS

Los valores esperados en una población normal son negativos (<20 EU/ml). Sin embargo, se ha establecido que algunos individuos aparentemente sanos y asintomáticos pueden resultar positivos a los anticuerpos ASCA de clase IgA o IgG⁹. Siempre que se sospeche un caso de EII, se recomienda la evaluación combinada de ASCA y de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (pANCA); de este modo aumenta el valor predictivo positivo en comparación con la evaluación separada de casos de EC mediante ASCA y de CU mediante pANCA^{14,15}. Véanse las tablas I y II al final de este documento.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se analizaron muestras de suero de pacientes con diagnóstico clínico de EC (30 muestras), de CU (30 muestras) y de individuos normales (6 muestras). Con los ensayos ELISA anti ASCA ImmuLisa™ se obtuvieron los siguientes resultados:

		ImmuLisa™ ASCA-IgA		
		Positivo	Negativo	Total
Diagnóstico de enfermedad	CD	12	18	30
	Otro	0	36	36
	Total	12	54	66
		Sensibilidad: 40%		Especificidad: 100%

		ImmuLisa™ ASCA-IgG		
		Positivo	Negativo	Total
Diagnóstico de enfermedad	CD	18	12	30
	Otro	6	31	36
	Total	23	43	66
		Sensibilidad: 60%		Especificidad: 86%

ES

La misma composición de muestras se utilizó para evaluar comparativamente el ensayo ASCA ImmuLisa™ (IgG e IgA) con otro ELISA ASCA disponible en comercio. Los resultados se muestran en la tabla III al final de este documento.

Estudio de reactividad cruzada

Con el ensayo ASCA ImmuLisa™ se analizó el suero de pacientes que padecían diferentes dolencias y de individuos positivos a determinados autoanticuerpos. Los resultados se presentan en la tabla IV al final de este documento.

Precisión:

Con el ensayo ImmuLisa™ se analizaron tres sueros diferentes positivos a ASCA en 10 repeticiones para determinar la variación intra ensayo, y tres sueros positivos para determinar la variación inter ensayo. Los resultados se presentan en la tabla V al final de este documento.

Intervalo de presentación de resultados:

Se analizaron con ImmuLisa™ cuatro muestras positivas a ASCA con la finalidad de determinar la precisión a intervalos regulares a lo largo del intervalo de presentación de resultados de los ensayos. Los resultados se presentan en la tabla VI al final de este documento.

Recuperación:

Muestras con concentraciones conocidas de ASCA se mezclaron con diluciones apropiadas de otra muestra positiva con cantidades conocidas de ASCA. Se determinaron los valores de ASCA de las muestras mezcladas y a partir de los valores obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación. Los resultados se presentan en la tabla VII al final de este documento.

Estudios clínicos:

Con el ensayo ImmuLisa™ ASCA (IgG e IgA) se analizaron 39 muestras de enfermedad de Crohn diagnosticada, 38 de colitis ulcerosa y 12 de trastornos gastrointestinales no relacionados. Los resultados se presentan en la tabla VIII al final de este documento.



IgA- und IgG-Anti-*Saccharomyces-cerevisiae*-Antikörper-ELISA (ASCA)

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1156A IgA-Anti-*Saccharomyces-cerevisiae*-Antikörper-ELISA 96 Bestimmungen

REF 1156G IgG-Anti-*Saccharomyces-cerevisiae*-Antikörper-ELISA 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von Anti-*Saccharomyces-cerevisiae*-Antikörpern (IgG oder IgA) in Humanserum bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung (CED) als Hilfsmittel bei der Diagnose von Morbus Crohn (MC).

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CU und MC) sind chronische remittierende Krankheiten mit unvorhersehbarem Verlauf und unterschiedlichem Therapiensprechen. CED wird aufgrund von klinischen, radiologischen, endoskopischen und histologischen Befunden diagnostiziert. Es wurde postuliert, dass immunologische, umweltbedingte, infektiöse (*Yersinia enterocolitica*) und genetische Faktoren das Risiko, an CED zu erkranken, erhöhen¹.

MC ist hauptsächlich eine Krankheit älterer Kinder und junger Erwachsener und tritt selten in der frühen Kindheit auf. Es wurden nur wenige epidemiologische Studien zur Bestimmung der Häufigkeit von MC in der allgemeinen Bevölkerung durchgeführt. In Skandinavien liegt die Häufigkeit von CED bei 7 pro 100.000, mit MC bei 1,3 pro 100.000². MC kann jeden Teil des Darms betreffen, und die Läsionen sind häufig ungleichmäßig und gelegentlich sehr ausgedehnt. Histologisch wird MC durch ein transmurales entzündliches Infiltrat, das hauptsächlich aus Lymphozyten und Makrophagen besteht, gekennzeichnet. In Biopsieproben werden oft Makrophagen-Anhäufungen beobachtet; gut entwickelte Granulome liegen jedoch nur in 50% der herausgeschnittenen Proben vor³. Zu den üblichen chirurgischen Verfahren bei MC zählen Segmentresektionen und Strikturoplastik². MC kann auch zusammen mit anderen Erkrankungen, z.B. Henoch-Schönlein-Purpura, auftreten⁴. Vaskulitis ist eine seltene Komplikation mit MC; es wurde jedoch über einige Fälle von kutaner Polyarteriitis nodosa mit MC berichtet⁴. Es besteht auch eine leichtere Form von perianalem MC, der von einer leichten, asymptomatischen Erkrankung bis hin zu einer schweren, behindernden Krankheit reichen kann⁵.

ASCA der Isotypen IgG und IgA liegen bei 60% der Fälle von diagnostiziertem MC vor¹. ASCA richten sich gegen Phosphopeptidomannane in den Zellwänden von Hefe (*S. cerevisiae*)⁶. ASCA können durch molekulare Mimikry und Priming eines stark mannosehaltigen bakteriellen oder viralen Antigens oder eines „körpereigenen Autoantigen-Moleküls“ induziert werden^{1,7}. Es wurde beobachtet, dass die ASCA-Konzentration bei MC nicht mit der Aktivität, Dauer und Behandlung der Krankheit zusammenhängt⁸.

ASCA treten häufig bei MC-Patienten mit positiver Familiengeschichte auf. ASCA werden nicht als spezifische Marker für eine genetische Anfälligkeit angesehen; ihr Vorliegen zeigt jedoch eine genetische Prädisposition an⁹. Studien mit eineiigen Zwillingen und in der jüdischen Bevölkerung weisen auf den Einfluss genetischer Faktoren auf die Pathogenese von MC hin¹⁰. Die Art der Vererbung scheint komplex und heterogen zu sein, mit möglichen CED-Genorten auf Chromosomen 2, 6, 12 und 16¹¹.

Kürzlich wurden serologische Testalgorithmen für die Diagnose von CED und die verbesserte Unterscheidung zwischen MC und CU vorgeschlagen¹. Fazit: Alle Fälle mit Verdacht auf CED müssen auf ASCA (IgG und IgA) untersucht werden.

TESTPRINZIP

Der ASCA-Test wird als Festphasen-ELISA durchgeführt. Mikrotiterplattenvertiefungen werden mit *Saccharomyces-cerevisiae*-Phosphopeptidomannan-Antigen beschichtet. Anschließend werden die unreaktierten Stellen blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibratoren und Serumproben vom Patienten werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert; dies erlaubt die Bindung der im Serum vorhandenen

DE

ASCA. Nicht gebundene Antikörper und andere Serumeiweiße werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. An die Vertiefungen gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-human-IgG- oder -IgA-Konjugats in die Vertiefungen nachgewiesen. Diese enzymkonjugierten Antikörper binden sich spezifisch an das humane Immunglobulin der entsprechenden Klasse. Nicht gebundenes Enzymkonjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antikörpern gegen *Saccharomyces cerevisiae* wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in Enzymeinheiten pro Milliliter (EU/ml) angegeben.

REAGENZIEN

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.** Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹².

WARNUNG – Natriumazid (NaN₃) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer.

Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten.

Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

Mitgelieferte Materialien

Immuliisa™ IgA-Anti-Saccharomyces-cerevisiae-Antikörper-ELISA REF 1156A

Immuliisa™ IgG-Anti-Saccharomyces-cerevisiae-Antikörper-ELISA REF 1156G

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen.

12 x 8	MICROPLATE ASCA	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit <i>S.-cerevisiae</i> -Phosphopeptidomannan beschichtet.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A ASCA *†	Gebrauchsfertiger Kalibrator A (<i>grüne Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B ASCA *†	Gebrauchsfertiger Kalibrator B (<i>lila Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C ASCA *†	Gebrauchsfertiger Kalibrator C (<i>blaue Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen ASCA.

DE

1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D ASCA *†	Gebrauchsfertiger Kalibrator D (<i>gelbe Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen ASCA.
1 x 1,5 ml	CONTROL + ASCA *†	Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (<i>rote Kappe</i>). Enthält ASCA-positives Humanserum.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (<i>weiße Kappe</i>). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS *†	Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Gebrauchsfertiger Serumverdünner . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Gebrauchsfertiges Enzymsubstrat . Enthält pNPP. Vor Licht schützen.
1 x 12 ml	STOP	Gebrauchsfertige Stopplösung .
2 x	BUF WASH	Waschpuffer in Pulverform . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

* Enthält <0,1% NaN₃

REF 1156A enthält IgA-ASCA-Kalibratoren und -Kontrollseren sowie IgA-Konjugat

REF 1156G enthält IgG-ASCA-Kalibratoren und -Kontrollseren sowie IgG-Konjugat

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

LOT Chargennummer

REF Bestellnummer

 Verwendbar bis

 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

IVD In-vitro-Diagnostikum

 Hersteller

 Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Stoppuhr

DE

- Saugfähige Papiertücher
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

PROBENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig diese Anweisungen, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Bringen Sie alle Reagenzien und Proben 30 Minuten lang auf Raumtemperatur (20-26 °C). Stellen Sie die Materialien sofort nach ihrer Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Bereiten Sie alle Verdünnungen der Patientenproben vor Beginn des Tests vor.
- **Geben Sie nicht verwendete Streifen sofort wieder in den Beutel mit dem Trockenmittel und verschließen Sie diesen fest, um den Kontakt mit Wasserdampf so gering wie möglich zu halten.**
- Waschschrift: Eine gute Methode ist unerlässlich. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Eine sorgfältige zeitliche Koordinierung ist wichtig. Die Inkubationszeiträume beginnen nach der Verteilung der Reagenzien.

Testverfahren

1. **ALLE REAGENZIEN MÜSSEN VOR BEGINN DES TESTS AUF RAUMTEMPERATUR (20-26 °C) GEBRACHT WERDEN.**
2. Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in der Mikrotiterplatte zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.
3. **Qualitative Bestimmung:** Verwenden Sie nur Kalibrator D. **Semi-quantitative Bestimmung:** Verwenden Sie Kalibratoren A-D wie im unten stehenden Beispiel gezeigt.

	QUALITATIVE BESTIMMUNG				SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG			
A	BLANK	S5			BLANK	S2		
B	NEG	S6			NEG	S3		
C	POS	S7			POS	S4		
D	CAL D	S8			CAL A	S5		
E	S1	S9			CAL B	S6		
F	S2	S10			CAL C	S7		
G	S3	S11			CAL D	S8		
H	S4	S12			S1	S9		
	1	2	3	4	1	2	3	4

4. Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:51**, indem Sie **10 µl** der Patientenprobe mit **0,5 ml** Serumverdünner vermischen.

DE

5. Geben Sie **100 µl** der Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.
Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null. Die Extinktion dieser Vertiefung sollte nicht über 0,3 liegen
6. Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur auf einer ebenen Oberfläche.
7. Waschschrift: Saugen Sie den Inhalt jeder Vertiefung gründlich aus. Geben Sie 200-300 µL des **rekonstituierten** Waschpuffers in alle Vertiefungen und saugen Sie ihn anschließend ab. Wiederholen Sie diese Schritte noch dreimal, bis Sie insgesamt viermal gewaschen haben. Drehen Sie die Platte um und klopfen Sie sie über saugfähigem Material ab, um jegliche nach dem letzten Waschen verbliebene Flüssigkeit zu entfernen. Trocknen Sie die Vertiefungen nicht vollständig.
8. Geben Sie 100 µL Konjugat in jede Vertiefung.
9. Inkubieren Sie die Vertiefungen **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
10. Waschschrift: Wiederholen Sie Schritt 7.
11. Geben Sie 100 µL Enzymsubstrat in jede Vertiefung.
12. Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
13. Geben Sie 100 µL Stopplösung in jede Vertiefung. Bewahren Sie bei der Zugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Geschwindigkeit bei, die Sie für das Enzymsubstrat verwendet haben. Lesen Sie die Extinktion (OD) jeder Vertiefung innerhalb einer Stunde nach Zufügen der Stopplösung bei 405 nm ab.
14. Lesen Sie die Extinktion (OD) jeder Vertiefung bei 405 nm mit einem Mikrotiterplattenreader mit einer oder zwei Wellenlängen gegen die auf Null-Extinktion eingestellte Blindprobe ab.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte $<0,3$ sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, verwenden Sie den Mittelwert der beiden Messungen, um die EU/ml zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

ERGEBNISSE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Ext. der Testprobe

----- X EU/ml von Kalibrator D = EU/ml Testprobe

Ext. von Kalibrator D

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste lineare Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.

Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte bestimmen zu können, sollten solche Serumproben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie die erhaltenen Einheiten mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren. Beispiele für Standardkurven erscheinen am Ende dieses Dokuments.

Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborergebnisse. Die unten angezeigten Werte wurden durch die Untersuchung von 64 normalen Blutspendern bestimmt; sie stellen den Mittelwert der normalen Proben plus 3 Standardabweichungen dar. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen.

ASCA-Werte EU/ml	Interpretation
IgA oder IgG <20	negativ
IgA oder IgG 20-25	Grenzbereich
IgA oder IgG >25	positiv

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Der ImmuLisa™ Test sollte nicht an stark hämolysierten, mikrobiell verunreinigten, lipämischen oder ikterischen Proben durchgeführt werden. Diese Methode sollte nur verwendet werden, um menschliche Serumproben zu testen. Es wird dringend empfohlen, auf beide Isotypen von ASCA hin zu testen. Ein Test auf nur einen und nicht beide Isotypen hin kann zu falschen negativen Ergebnissen führen. Ein negatives ASCA-Ergebnis schließt das Vorliegen von Morbus Crohn nicht aus. Ein negatives ASCA-Ergebnis schließt das Vorhandensein von ASCA nicht aus, da die Konzentration der Antikörper unter der Nachweisgrenze des Tests liegen kann. Darüber hinaus kann eine Diagnose nicht allein aufgrund der ASCA-Ergebnisse gestellt werden. Die Ergebnisse anderer Labortests und die klinischen Befunden müssen ebenfalls berücksichtigt werden. Immunkomplexe oder andere Immunglobulin-Aggregate in der Patientenprobe können bei diesem Test zu einer verstärkten nicht-spezifischen Bindung führen und falsche positive Ergebnisse verursachen. ASCA treten auch bei Patienten mit CU, deren Verwandten ersten Grades und in gemischten Familien mit MC und CU auf^{3,9}. Sie liegen in geringerem Ausmaß auch bei einigen anderen Autoimmunkrankheiten vor¹³. Die Leistung des Tests bei pädiatrischen MC- und CU-Patienten wurde nicht beurteilt.

ERWARTETE WERTE

Der erwartete Wert in einer normalen Bevölkerung ist negativ (<20 EU/ml). Es wurde jedoch festgestellt, dass bei einigen anscheinend gesunden Personen ohne Symptome der Test auf IgA- oder IgG-ASCA positiv ausfallen kann. Es wird empfohlen, bei allen Fällen mit Verdacht auf CED sowohl die ASCA als auch die perinukleären antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörper (pANCA) zu bewerten, um den positiven Vorhersagewert im Vergleich zu der individuellen Bewertung von MC-Fällen mittels ASCA und CU-Fällen mittels pANCA zu verbessern^{14,15}. Siehe Tabellen I und II am Ende dieses Dokuments.

LEISTUNGSMERKMALE

Proben von Patienten mit einer klinischen Diagnose von MC (30 Proben) und CU (30 Proben) wurden zusammen mit normalen Humanseren (6 Proben) getestet. Folgende Ergebnisse wurden mit dem ImmuLisa™ Anti-ASCA-ELISA erhalten:

Krankheits- diagnose	ImmuLisa™ ASCA-IgA			
	MC	Positiv	Negativ	Gesamt
MC	12	18	30	
Andere	0	36	36	
Gesamt	12	54	66	
	Sensitivität: 40%		Spezifität: 100%	

		ImmuLisa™ ASCA-IgG		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Krankheits- diagnose	MC	18	12	30
	Andere	6	31	36
	Gesamt	23	43	66
		Sensitivität: 60%		Spezifität: 86%

Derselbe Satz Proben wurde für den Vergleich des ImmuLisa™ ASCA (IgA und IgG) mit einem anderen im Handel erhältlichen ASCA-ELISA verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle III am Ende dieses Dokuments angezeigt.

Kreuzreaktivitätsstudie:

Die Seren von Patienten mit unterschiedlichen Krankheiten und von Personen mit positiven Ergebnissen für bestimmte Autoantikörper wurden mit dem ImmuLisa™-Test auf ASCA hin getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV am Ende dieses Dokuments angezeigt.

Genauigkeit:

Drei verschiedene ASCA-positive Seren wurden zehnmal mit dem ImmuLisa™ getestet, um die intraserielle Variation zu bestimmen; drei positive Seren wurden zehnmal zur Bestimmung der interseriellen Variation getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle V am Ende dieses Dokuments angezeigt.

Nachweisbereich:

Vier ASCA-positive Proben wurden mit dem ImmuLisa™ getestet, um über den Nachweisbereich des Tests hinweg die Genauigkeit in regelmäßigen Abständen zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI am Ende dieses Dokuments angezeigt.

Wiederfindung:

Proben mit bekannten ASCA-Konzentrationen wurden mit geeigneten Verdünnungen einer anderen positiven Probe mit einer bekannten Menge an ASCA gemischt. Die ASCA-Spiegel der gemischten Proben wurden bestimmt und die Wiederfindung in Prozent wurde aus den erhaltenen Werten errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle VII am Ende dieses Dokuments angezeigt.

Klinische Studien:

39 diagnostizierte Fälle von Morbus Crohn, 38 Fälle von Colitis ulcerosa und 12 Fälle von nicht mit diesen verwandten gastrointestinalen Erkrankungen wurden sowohl mit dem ImmuLisa™ IgG-ASCA als auch mit dem IgA-ASCA getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle VIII am Ende dieses Dokuments angezeigt.



Anticorps Anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) IgA et IgG ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1156A Anticorps IgA Anti-Saccharomyces cerevisiae ELISA 96 Tests

REF 1156G Anticorps IgG Anti-Saccharomyces cerevisiae ELISA 96 Tests

ImmuliS[™] anti-Saccharomyces cerevisiae est un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection et la semi-quantification des anticorps anti-Saccharomyces cerevisiae (IgG ou IgA) dans le sérum humain de patients souffrant de désordres inflammatoires de l'intestin (IBD) et constitue une aide précieuse pour le diagnostic de la maladie de Crohn (CD).

GENERALITES

Les désordres inflammatoires de l'intestin (UC et CD) sont des maladies chroniques à répétition imprévisibles et présentant des réponses très différentes aux traitements. Le diagnostic de l'IBD est basé sur des observations cliniques, radiologiques, endoscopiques et histologiques. Les facteurs immunologiques, environnementaux, infectieux (*Yersinia enterocolitica*) et génétiques ont été reportés comme facteurs de risque de l'IBD¹.

Le CD se retrouve principalement chez les enfants plus âgés et les jeunes adultes, très rarement pendant la petite enfance. Quelques études épidémiologiques ont été conduites pour déterminer l'incidence du CD dans la population générale. Uniquement pour la population scandinave, l'incidence de l'IBD est de 7 pour 100 000, et le CD de 1.3 pour 100 000². Le CD peut affecter toutes les parties de l'intestin, les lésions étant souvent en taches et occasionnellement très étendues. Histologiquement, le CD est caractérisé par une infiltration inflammatoire des membranes composée principalement de lymphocytes et macrophages. Les agrégats de macrophages sont souvent détectés dans les biopsies, mais les agrégats plus développés sont présents chez seulement 50% des échantillons testés³. Les procédés chirurgicaux habituels pour le CD comprennent l'ablation segmentaire et la structuroplastie². Le CD peut également se manifester de lui-même par d'autres désordres tels le purpura Henoch-Schonlein⁴. Les angéites sont une complication inhabituelle du CD, bien que quelques cas de polyartérites noueuses cutanées associées au CD aient été reportés⁴. Il existe une forme atténuée de CD périanale allant de l'absence de symptômes cutanés à des troubles très sévères⁵.

Les ASCA d'isotype IgA et IgG sont présents dans 60% des cas où le CD a été diagnostiqué¹. Les ASCA sont dirigés contre les phosphopeptidomannans présents dans les parois des cellules de la levure (*S. cerevisiae*)⁶. Les ASCA peuvent être détectés grâce à leur mimétisme moléculaire et leur amorçage par un antigène viral ou une bactérie contenant du mannose ou une « molécule auto antigénique »^{1,7}. Il a été observé que les niveaux d'ASCA dans les cas de CD sont indépendants de l'activité de la maladie, de sa durée et de son traitement⁸.

Les ASCA se retrouvent fréquemment chez les patients avec antécédents familiaux. Les ASCA ne sont pas considérés comme des marqueurs spécifiques de susceptibilité génétique, mais leur présence indique une prédisposition génétique⁹. Des études sur des jumeaux monozygotes et sur la population juive indiquent une influence des facteurs génétiques sur la pathogenèse du CD¹⁰. Le mode d'héritage semble être complexe et hétérogène, avec des locus d'IBD situés sur les chromosomes 2, 6, 12 et 16¹¹.

Récemment, des algorithmes de tests sérologiques ont été proposés pour le diagnostic de l'IBD et pour augmenter la discrimination entre CD et UC¹. En résumé, tous les cas suspects d'IBD doivent être testés en recherche d'ASCA (IgA et IgG).

PRINCIPES DU TEST

L'antigène *Saccharomyces cerevisiae* phosphopeptidomannan est fixé sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène et, ensuite, les sites n'ayant pas réagi sont bloqués pour réduire l'attache non spécifique. Les contrôles, les étalons et les sérums de patients dilués sont ajoutés dans différents puits, autorisant chaque anticorps ASCA présent à se lier à l'antigène en place. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique anti- IgA ou IgG humaine est alors ajouté dans chaque puit pour révéler les anticorps du patient. Ces anticorps se lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine. Après une étape

d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat enzymatique (pNPP) suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Après avoir arrêté la production enzymatique de produit coloré, la présence ou l'absence d'anticorps ASCA sera déterminée par lecture au spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA par millilitres (EU/ml).

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs du coffret entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.** Ne pas employer le réactif si il est trouble ou si un précipité s'est formé. Tous les réactifs doivent être portés à la température ambiante (20-25°C) avant de les utiliser. Le tampon de lavage est stable jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes. Reconstituer le tampon de lavage en y ajoutant de l'eau distillée ou déionisée pour un volume de 1 L. Les micropuits ne peuvent être utilisés qu'une seule fois.

Précautions

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage¹².

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN₃). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.

Respecter les techniques de laboratoire réduisant au minimum la contamination microbienne et chimique. Ne pas employer après la date d'échéance.

Matériel fourni

ImmuLisa™ Anticorps IgA Anti-Saccharomyces cerevisiae ELISA **REF** 1156A

ImmuLisa™ Anticorps IgG Anti-Saccharomyces cerevisiae ELISA **REF** 1156G

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.

12 x 8	MICROPLATE ASCA	Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus de <i>S. cerevisiae</i> phosphopeptidomannan.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A ASCA *†	Etalon A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B ASCA *†	Etalon B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C ASCA *†	Etalon C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D ASCA *†	Etalon D (<i>couvercle jaune</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ASCA.

FR

1 x 1,5 ml	CONTROL + ASCA *†	Contrôle positif (<i>couvercle rouge</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ASCA.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Contrôle négatif (<i>couvercle blanc</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS *†	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines. Code couleur rose.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines. Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL *	Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. Protéger de la lumière.
1 x 12 ml	STOP	Solution d'arrêt prête à l'emploi.
2 x	BUF WASH	Tampon de lavage en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

* Contient < 0.1% NaN₃

REF 1156A contient les étalons IgA-ASCA, les solutions de contrôle et le conjugué IgA


REF 1156G contient les étalons IgG-ASCA, les solutions de contrôle et le conjugué IgG

Symboles utilisés sur les étiquettes:

LOT Numéro de lot

REF Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant

 Température de conservation

 Lire les instructions d'utilisation

IVD Pour usage diagnostique In vitro

 Fabricant

 Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes de 5 à 1000 µl
- Bouts de pipette jetables
- Petits tubes (ex : 12 X 75 mm) et porte-tubes
- Eau distillée ou déionisée
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm. Si la longueur d'onde double est disponible, le filtre de référence sera de 600-650 nm.
- Bouteille pour le tampon de lavage
- Timer
- Papier absorbant
- Bac pour le lavage automatique capable de dispenser 200 µl

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

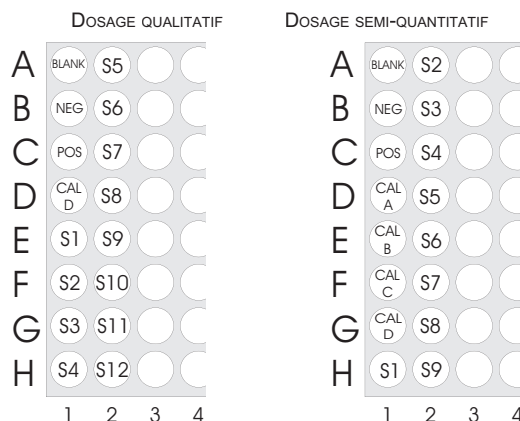
METHODE

Préparation du test

- Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante pendant 30 minutes avant de les utiliser. Replacer les produits au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- **Remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient contenant le dessiccateur, refermer hermétiquement pour minimiser toute exposition à l'humidité.**
- Lavage: il est important d'utiliser une bonne technique. **Il est recommandé d'utiliser un bac de lavage des micro-lamelles automatique.**
- Utiliser une pipette multicanaux capable de remplir 8 puits simultanément. Ceci rend le processus plus rapide et fournit un temps d'incubation plus uniforme.
- La synchronisation est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution des réactifs.

Exécution du test

1. **Porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20-26°C) avant de commencer le test.**
2. Indiquer sur une feuille du protocole la position des échantillons sur la micro-lamelle. Il est de bonne pratique de vérifier les échantillons en double.
3. **Détermination qualitative** : employer uniquement l'étalon D. **Détermination semi-quantitative** : employer étalons A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.



4. Préparer une dilution de **1:51** de l'échantillon patient en mélangeant **10 µl** de l'échantillon patient à **0.5 ml** de diluant pour échantillons.
5. Ajouter **100 µl** des étalons, des échantillons de patients dilués, des contrôles négatif et positif dans les puits indiqués sur la feuille de protocole.

Note : Inclure un puit avec **100 µl** de diluant pour échantillons comme blanco de réactif. La lecture ELISA de ce blanco devrait être nulle. L'absorbance de ce micropuit ne devra pas dépasser 0.3

FR

6. Laisser incuber pendant **30 minutes** (\pm 5 minutes) à température ambiante.
7. Lavage: aspirer soigneusement le contenu de chaque puit. Ajouter 200 à 300 μ l de tampon **reconstitué** dans tous les puits et aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération trois fois supplémentaires pour un total de quatre lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant pour enlever tout liquide de lavage résiduel. Ne pas sécher complètement.
8. Ajouter 100 μ l de conjugué dans chaque puit.
9. Laisser incuber pendant **30 minutes** (\pm 5 minutes) à température ambiante.
10. Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 7.
11. Ajouter 100 μ l de substrat enzymatique dans chaque puit.
12. Laisser incuber **30 minutes** (\pm 5 minutes) à température ambiante.
13. Ajouter 100 μ l de solution d'arrêt dans chaque puit. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du substrat enzymatique. Lire la densité optique (D.O.) dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.
14. Lire la densité optique (D.O.) de chaque puit à 405nm en utilisant un lecteur simple ou à longueur d'onde double en prenant le blanco de réactif comme référence de D.O. nulle.

Contrôle qualité

Les étalons, les contrôles positifs et négatifs et un blanco doivent être présents dans chaque série de test pour garantir l'intégrité et la précision de ce dernier. La lecture de densité optique du blanco doit être inférieure à 0.3. L'étalon A doit avoir une lecture de densité optique supérieure à 1.0, sinon le test doit être répété. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est réalisé en double, prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer les concentrations en anticorps anti-hu tTG. Lors des déterminations qualitatives, la densité optique de l'étalon D doit être plus grande que celle du contrôle négatif et plus petite que celle du contrôle positif. Pour les déterminations semi-quantitatives, le contrôle positif doit donner des valeurs dans les fourchettes figurant sur le flacon.

RESULTATS

Calcul des résultats

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

1. DETERMINATION QUALITATIVE

$$\frac{\text{D.O. Echantillon}}{\text{D.O. Etalon D}} \times \text{XE U/ml étalon D} = \text{EU/ml Echantillon}$$

2. DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Tracer l'absorbance des étalons A à D par rapport leur concentration respective sur un graphique linéaire. Tracer la concentration en EU / ml sur l'axe des X et l'absorbance sur l'axe Y et dessiner la courbe la plus proche. Déterminer les concentrations des échantillons patients provenant de la courbe par leurs valeurs correspondantes d'absorbance.

Etalons

Les étalons sont fournis pour une détermination semi-quantitative et doivent être employés lors de chaque test. Les échantillons patients contenant les niveaux les plus élevés d'anticorps peuvent donner des valeurs d'absorbance plus grandes que celles de l'étalon A. Pour la détermination des valeurs semi-quantitatives précises de tels échantillons, il faut les diluer et les retester jusqu'à ce que les résultats puissent être lus sur la courbe d'étalonnage. Pour la détermination en EU / ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution. Des exemples de courbes standard sont présentés à la fin de ce document.

Interprétation

L'information suivante sert seulement de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire. Ces valeurs ont été déterminées en testant 64 échantillons de sang de donneurs. Les valeurs indiquées ci-dessous sont la moyenne des sujets plus déviation standard de 3. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Valeurs ASCA	Interprétation
IgA ou IgG <20 EU/ml	Négatif (-)
IgA ou IgG 20 – 25 EU/ml	Indéterminé
IgA ou IgG >25 EU/ml	Positif (+)

LIMITES D'UTILISATION

Il est recommandé de ne pas réaliser le test ImmuLisa™ anti-hu tTG avec des échantillons fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne. Le test doit être réalisé sur des sérums humains uniquement. Il est fortement recommandé de réaliser le test sur les 2 isotypes d'ASCA. LE fait de tester un isotype et pas l'autre peut entraîner des résultats faussement négatifs. Un résultat négatif pour la recherche d'ASCA ne doit pas éliminer la présence de la maladie de Crohn. Un test de recherche ASCA négatif ne doit pas éliminer la présence d'anticorps ASCA car la concentration de ces anticorps peut se trouver sous la limite de détection du test. De plus, le diagnostic ne peut être établi uniquement sur le résultat du test ASCA. Les résultats d'autres tests de laboratoire et d'observations cliniques doivent également être considérés. La présence de complexes immunitaires ou d'autres agrégats d'immunoglobulines dans l'échantillon du patient peut causer une augmentation de l'attache non spécifique et produire des faux négatifs. Les ASCA se retrouvent aussi chez des patients atteints de UC, leurs parents de premier degré et les familles mixtes atteints de CD et UC^{3,9}. Ils sont également présents en extension moindre dans d'autres maladies autoimmunitaires¹³. Les performances de test n'ont pas été établies pour les patients enfants souffrant de CD et UC.

VALEURS PREVUES

Les valeurs prévues dans une population normale sont négatives (< 20 EU/ml). De plus, certains patients apparemment en bonne santé et ne présentant pas de symptômes peuvent être positifs pour la recherche des anticorps ASCA IgA et IgG⁹. L'examen combiné des ASCA et des anticorps p-ANCA est conseillée pour tous les cas de IBD, pour augmenter la valeur de prédiction par comparaison aux déterminations individuelles de cas de CD par les ASCA et de UC par les p-ANCA^{14,15}. Voir tableaux I et II à la fin de ce document.

PERFORMANCES

Des échantillons obtenus de patients souffrant de CD (30) et de UC (30) ont été testés ensemble à des sérums de patients en bonne santé (6). Les résultats obtenus sont les suivants :

		ImmuLisa™ ASCA-IgA		
		Positif	Négatif	Total
Diagnostic maladie	CD	12	18	30
	Autre	0	36	36
	Total	12	54	66
		Sensibilité: 40%		Spécificité: 100%

		ImmuLisa™ ASCA-IgG		
		Positif	Négatif	Total
Diagnostic maladie	CD	18	12	30
	Autre	6	31	36
	Total	23	43	66
		Sensibilité: 60%		Spécificité: 86%

FR

Le même ensemble de sérums a été testé pour faire une évaluation comparative de ImmuLisa™ ASCA (IgG et IgA) par rapport à d'autres tests ELISA actuellement sur le marché. Les résultats sont présentés dans le tableau III à la fin de ce document.

Etude de Réactivité Croisée :

Des sérums de patients souffrant de conditions différentes et des individus positifs pour certains anticorps ont été testés pour les ASCA avec le test en objet. Les résultats sont présentés dans le tableau IV à la fin de ce document.

Précision :

Trois différents sérums positifs aux ASCA ont été testés à 10 reprises. Les coefficients de variation intra et inter-test (CV) de l'ELISA ASCA ont été calculés. Les résultats sont présentés dans le tableau V à la fin de ce document.

Gamme répétitive :

Quatre échantillons positifs à la recherche d'ASCA ont été testés avec ImmuLisa™ pour déterminer la précision aux mêmes intervalles à travers la gamme répétitive des tests. Les résultats sont présentés dans le tableau VI à la fin de ce document.

Récupération

Des échantillons avec des concentrations connues ASCA ont été mélangés aux dilutions appropriées d'un autre échantillon positif avec des quantités connues d'ASCA. Les niveaux d'anticorps ASCA des échantillons mélangés ont été déterminés et à partir de ces valeurs le pourcentage de récupération calculé. Les résultats sont présentés dans le tableau VII à la fin de ce document.

Etudes cliniques :

Des sérums provenant de 39 cas de maladie de Crohn diagnostiqués, 38 cas de colite ulcéreuse et 12 cas de désordres gastro-intestinaux non liés ont été testés avec ImmuLisa™ ASCA IgG et IgA. Les résultats sont présentés dans le tableau VIII à la fin de ce document.



Test Anticorpi Anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) IgA e IgG ELISA

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1156A Anticorpi Anti-Saccharomyces cerevisiae IgA ELISA 96 Determinazioni

REF 1156G Anticorpi Anti-Saccharomyces cerevisiae IgG ELISA 96 Determinazioni

FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la rilevazione e la semiquantificazione di anticorpi anti-*saccharomyces cerevisiae* di classe IgG o IgA nel siero di pazienti con disturbi infiammatori intestinali (IBD) come strumento di aiuto nella diagnosi del morbo di Crohn (CD).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

I disturbi infiammatori intestinali (UC e CD) sono malattie croniche remittenti con decorso imprevedibile e con risposta variabile alla terapia. La diagnosi di questi disturbi è basata su evidenze cliniche e risultati di esami radiologici, endoscopici e istologici. Si ritiene che fattori di natura immunologica, ambientale, infettiva (*Yersinia enterocolitica*) e genetica possono accrescere il rischio di sviluppare le IBD¹. Il morbo di Crohn è una patologia che colpisce i bambini in età avanzata e i giovani adulti, mentre è rara nell'infanzia. Sono stati condotti pochi studi epidemiologici per accertare l'effettiva incidenza del morbo di Crohn nella popolazione generale. Nella popolazione scandinava, l'incidenza di IBD è di 7 su 100.000, con CD in 1,3 su 100.000². Il morbo di Crohn può colpire qualsiasi parte dell'intestino e le lesioni sono spesso irregolari e occasionalmente molto estese. Dal punto di vista istologico, il morbo di Crohn è caratterizzato da infiltrato infiammatorio transmurale prevelentemente dei linfociti e dei macrofagi. Aggregati di macrofagi sono spesso visibili in campioni biopsici, ma la presenza di granulomi ben sviluppati si riscontra in solo il 50% dei campioni resezionati³. La procedura chirurgica in uso per il morbo di Crohn include la resezione segmentale e la stricturoplastica². Il morbo di Crohn può anche manifestarsi in concomitanza con altri disturbi come la porpora di Henoch-Schönlein⁴. La vasculite è una complicanza non comune del CD, tuttavia, in combinazione con la patologia sono stati riportati alcuni casi di poliartrite cutanea nodosa⁴. Esiste inoltre una forma di CD perianale che può variare da una forma lieve e asintomatica della malattia a un grave disturbo disabilitante⁵. Gli ASCA di classe IgG e IgA sono presenti nel 60% dei casi diagnosticati con CD¹. Gli ASCA sono diretti contro i fosfopeptidomannani delle pareti cellulari del lievito (*S. cerevisiae*)⁶. Gli ASCA possono essere prodotti per mimetismo molecolare e per attivazione da parte di antigeni batterici o virali contenenti mannosio o una "molecola autoantigenica"^{1,7}. È stato osservato che nel morbo di Crohn, i livelli degli ASCA sono indipendenti dall'attività, dalla durata e dal trattamento della malattia⁸ e sono spesso presenti in pazienti con una storia di positività familiare. Gli ASCA non vengono considerati marcatori specifici della suscettibilità genetica, ma la loro presenza indica una predisposizione genetica⁹. Studi condotti in gemelli monozigoti e nella popolazione ebraica confermano l'influenza dei fattori genetici nella patogenesi del morbo di Crohn¹⁰. La modalità di ereditarietà sembra essere complessa e eterogenea, con loci candidati delle IBD posti sui cromosomi 2, 6, 12, e 16¹¹. Recentemente, è stato proposto l'utilizzo di algoritmi da test sierologici per diagnosticare i disturbi infiammatori intestinali e per migliorare la discriminazione tra CD e UC¹. Concludendo, tutti i casi con sospetti disturbi infiammatori intestinali devono essere testati per la presenza degli ASCA (IgG e IgA).

PRINCIPI DELLE METODICHE

Il test ASCA viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con l'antigene fosfopeptidomannano *Saccharomyces cerevisiae*; segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito, per ridurre i legami non specifici. Controlli, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, e ciò permette agli ASCA presenti nel siero di legarsi. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati sono rilevati da un coniugato anti IgG o IgA umana marcato con un enzima aggiunto ai pozzetti. Questi anticorpi coniugati con l'enzima si legano in modo specifico all'immunoglobulina umana della classe appropriata. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi anti-*Saccharomyces cerevisiae* viene rilevata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato pNPP. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione

di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in unità di enzima per millilitro (EU)/ml.

REAGENTI

CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.** Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Le strisce con i pozzetti sono monouso.

Precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali¹².

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN₃) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Usare tecniche di laboratorio idonee per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Materiali forniti

Anticorpi Anti-*Saccharomyces cerevisiae* IgA ELISA ImmuLisa™ **REF** 1156A

Anticorpi Anti-*Saccharomyces cerevisiae* IgG ELISA ImmuLisa™ **REF** 1156G

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	MICROPLATE ASCA	Micropiastra con micropozzetti asportabili rivestiti con <i>S. cerevisiae fosfopeptidomannano</i> .
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A ASCA *†	Calibratore A (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B ASCA *†	Calibratore B (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C ASCA *†	Calibratore C (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D ASCA *†	Calibratore D (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-ASCA.
1 x 1,5 ml	CONTROL + ASCA *†	Controllo Positivo (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per ASCA.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS *†	Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgA umane pronto all'uso; di colore rosa.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umane pronto all'uso; di colore rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente siero pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato Enzimatico pronto all'uso. Contiene pNPP. Proteggere dalla luce.

IT

1 x 12 ml **STOP**

Soluzione di Stop pronta all'uso.

2 x **BUF WASH**

Tampone di Lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

* Contiene < 0,1% NaN₃

? **REF** 1156A contiene calibratori ASCA-IgA, controlli e coniugato IgA.

REF 1156G contiene calibratori ASCA-IgG, controlli e coniugato IgG.


Simboli usati sulle etichette:

LOT Numero di lotto

REF Numero catalogo

 Scadenza

 Temperatura di conservazione

 Leggere le istruzioni per l'uso

IVD Uso diagnostico in vitro

 Produttore

 Numero di test

Materiali necessari ma non forniti

- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito
- Timer
- Carta assorbente
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

RACCOLTA DEL CAMPIONE

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

PROCEDURA

Note sul test

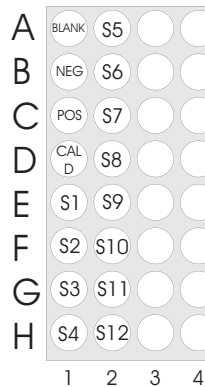
- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti (20-26°C) per 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i materiali non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.

- **Riporre immediatamente le strisce inutilizzate nella busta di confezionamento dove sono presenti dissecanti e sigillare per minimizzare l'esposizione a vapore acqueo.**
- Fase di lavaggio: Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e il tempo di incubazione più uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta dei reagenti.

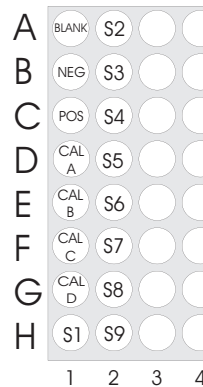
Metodo del test

1. **TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) PRIMA DELL'INIZIO DEL TEST.**
2. Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nella micropiastra. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
3. **Determinazione qualitativa:** usare unicamente il Calibratore D.
Determinazione semiquantitativa: usare i calibratori da A a D pronti all'uso, come illustrato nell'esempio di disposizione riportato sotto:

DETERMINAZIONE QUALITATIVA



DETERMINAZIONE SEMI-QUANTITATIVA



4. Preparare una diluizione **1:51** del campione del paziente mescolando **10 µl** di campione con **0,5 ml** di Diluente del Siero.
5. Aggiungere **100 µl di Calibratori, di Controlli Positivi e Negativi e di campioni del paziente diluiti nei pozzetti appropriati come indicato sul foglio protocollo.**
Nota: Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco. L'assorbanza del bianco non deve essere superiore a 0,3.
6. Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente su una superficie piana.
7. Fase di lavaggio: Aspirare completamente i contenuti di ciascun pozzetto. Aggiungere 200-300 µL del tampone di lavaggio **ricostituito** in tutti i pozzetti e poi aspirare. Ripetere questa sequenza per altre tre volte per un totale di quattro lavaggi. Invertire la piastra e batterla su materiale assorbente per rimuovere residui di liquido dell'ultimo lavaggio. Non asciugare i pozzetti completamente.
8. Aggiungere 100 µL di Coniugato in ogni pozzetto.
9. Incubare i pozzetti per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
10. Fase di lavaggio: Ripetere la procedura 7.
11. Aggiungere 100µL di Substrato Enzimatico in ogni pozzetto.

IT

12. Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
13. Aggiungere 100 μ L di Soluzione di Stop in ciascun pozzetto. Per l'aggiunta della Soluzione di Stop rispettare lo stesso ordine e gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
14. Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia contro il bianco impostato su assorbanza 0.

Controllo di Qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere $<0,3$. Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore <20 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, prendere la media delle due letture per determinare il valore EU/ml. Se si eseguono le determinazioni qualitative, la densità ottica del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore dell'assorbanza del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

ASSORBANZA DEL CAMPIONE DEL TEST

----- X EU/ml di Calibratore D = EU/ml del Campione

Assorbanza del calibratore D

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.

Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione. Vedere le curve standard del campione (Figura 1) alla fine di questo foglio.

Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati. I valori illustrati sotto sono stati determinati analizzando 64 campioni di siero da donatori di sangue normali e rappresentano la media del normale + 3DS. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali.

Valori ASCA EU/ml	Interpretazione
IgA o IgG < 20	Negativo
IgA o IgG 20-25	Borderline
IgA o IgG > 25	Positivo

LIMITAZIONI DEL TEST

Il Test per gli Anticorpi Anti-ASCA ELISA ImmuLisa™ non deve essere eseguito su campioni fortemente emolizzati, microbiologicamente contaminati lipemici o itterici. Questa metodica deve essere usata per testare solo campioni di siero umano. Si raccomanda di analizzare entrambi gli isotipi ASCA, eseguire il test per un solo isotipo può portare a risultati falsamente negativi. Un risultato negativo per gli ASCA non esclude la presenza del morbo di Crohn e tanto meno la presenza di questi anticorpi nel siero, in quanto la loro concentrazione nel campione potrebbe essere inferiore al limite rilevabile da quest'analisi. Inoltre, la diagnosi non può essere effettuata unicamente sulla base dei risultati ASCA, dovranno essere considerati i risultati di altri esami di laboratorio e le evidenze cliniche. La presenza di complessi immuni o di altri aggregati di immunoglobuline nel campione può causare un livello maggiore di legami non specifici e produrre risultati falso-positivi in quest'analisi. Gli ASCA compaiono in pazienti con UC, nei loro familiari di primo grado e in famiglie miste con CD e UC^{3,9}. Sono inoltre presenti, in forma minore, in altre patologie autoimmuni¹³. Non è stata stabilita la performance dell'analisi per il morbo di Crohn pediatrico e per i pazienti con UC.

VALORI ATTESI

I valori attesi in una popolazione normale sono negativi (<20 EU/ml). Tuttavia, è stato determinato che alcuni individui apparentemente sani e asintomatici possono presentare valori positivi per gli anticorpi anti-ASCA di classe IgA o IgG. Per tutti i casi con sospetti disturbi infiammatori intestinali si consiglia la valutazione combinata degli ASCA e degli anticorpi perinucleari anti-neutrofili citoplasmatici (pANCA) per aumentare il valore predittivo positivo rispetto alle singole valutazioni degli ASCA per i casi di CD e dei pANCA per i casi di UC^{14, 15}. Vedere Tabelle I e II alla fine di questo foglio.

Caratteristiche di PERFORMANCE

Sono stati testati sieri da pazienti con diagnosi clinica di CD (30 campioni) e di UC (30 campioni) oltre a sieri umani normali (6 campioni). I risultati ottenuti con il Test per gli Anticorpi Anti-ASCA ELISA ImmuLisa™ sono i seguenti:

		ASCA-IgA ImmuLisa™		
		Positivo	Negativo	Totale
Diagnosi della patologia	CD	12	18	30
	Altro	0	36	36
	Totale	12	54	66
		Sensibilità: 40%		Specificità: 100%

		ASCA-IgG ImmuLisa™		
		Positivo	Negativo	Totale
Diagnosi della Patologia	CD	18	12	30
	Altro	6	31	36
	Totale	23	43	66
		Sensibilità: 60%		Specificità: 86%

Lo stesso set di campioni è stato usato per una valutazione comparativa del test ASCA (IgG e IgA) ImmuLisa™ rispetto ad un altro test ELISA disponibile in commercio. I risultati sono raccolti nella Tabella III alla fine di questo foglio.

Reattività incrociata:

Con il test ImmuLisa™ sono stati analizzati per gli ASCA sieri di pazienti affetti da varie condizioni e di individui positivi a certi anticorpi. I risultati sono raccolti nella Tabella IV alla fine di questo foglio.

IT

Precisione:

Tre sieri positivi per gli ASCA sono stati analizzati con il test ImmuLisa™ in 10 replicati per determinare la variazione all'interno di uno stesso saggio, sono stati poi testati altri tre sieri positivi per determinare la variazione tra un saggio e l'altro. I risultati sono raccolti nella Tabella V alla fine di questo foglio illustrativo.

Intervallo riportabile:

Con il test ImmuLisa™ sono stati analizzati quattro campioni positivi per gli ASCA per determinare la precisione a intervalli uguali attraverso il range riportato per quest'analisi. I risultati sono raccolti nella Tabella VI alla fine di questo foglio illustrativo .

Recupero:

I campioni con concentrazioni note di anticorpi ASCA sono stati miscelati con diluizioni appropriate di un altro campione positivo con quantitativo noto di anticorpi ASCA. Sono stati determinati i livelli di anticorpi ASCA nei campioni miscelati e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di recupero. I risultati sono raccolti nella Tabella VII alla fine di questo foglio.

Studi Clinici:

Con il Test per gli Anticorpi anti-ASCA IgG e IgA ImmuLisa™ sono stati analizzati 39 casi con diagnosi di morbo di Crohn, 38 casi con colite ulcerosa e 12 casi con disturbi gastrointestinali non collegati. I risultati sono raccolti nella Tabella VIII alla fine di questo foglio illustrativo.



IMMCO
DIAGNOSTICS

ELISA para Anticorpos IgA e IgG - Anti-*Saccharomyces cerevisiae*

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1156A ELISA para Despiste de Anticorpos IgA Anti-*Saccharomyces cerevisiae* 96 Determinações

REF 1156G ELISA para Despiste de Anticorpos IgG Anti-*Saccharomyces cerevisiae* 96 Determinações

APLICAÇÃO

Um teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) para detecção e semiquantificação de anticorpos (IgG ou IgA) anti-*Saccharomyces cerevisiae* em soro humano de doentes com doença inflamatória intestinal (DII), como auxiliar no diagnóstico da doença de Crohn (DC).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (colite ulcerosa e doença de Crohn) são doenças remitentes crónicas que evoluem de forma imprevisível e têm respostas variáveis ao tratamento. O diagnóstico de doença inflamatória intestinal baseia-se em achados clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos. Tem sido presumido que existem factores imunológicos, ambientais, infecciosos (*Yersinia enterocolitica*) e genéticos aumentam o risco de desenvolver esta doença¹. A doença de Crohn é uma doença que atinge crianças mais velhas e jovens adultos, sendo rara na infância. Na população em geral, foram realizados pouco estudos epidemiológicos sobre a incidência de doença de Crohn. Apenas no caso da população escandinava, a incidência de doença inflamatória intestinal é de 7 em cada 100 000 pessoas, afectando a doença de Crohn 1,3 pessoas em cada 100 000². A doença de Crohn pode afectar qualquer parte do intestino e as lesões são muitas vezes irregulares e por vezes muito extensas. A doença de Crohn caracteriza-se, histologicamente, por um infiltrado inflamatório transmural composto predominantemente por linfócitos e macrófagos. São com frequência observados agregados de macrófagos em amostras de biopsia, embora granulomas bem desenvolvidos só estejam presentes em 50% de amostras ressectadas³. Os procedimentos cirúrgicos habituais para a doença de Crohn incluem a ressecção segmentar e a estricturoplastia². A doença de Crohn também se manifesta associada a outras doenças como, por exemplo, a púrpura de Henoch-Schonlein⁴. A vasculite é uma complicação invulgar da doença de Crohn; foram, no entanto, relatados alguns casos de poliarterite nodosa cutânea associada a doença de Crohn CD⁴. Existe uma forma de doença de Crohn perianal com sintomas menos graves, que pode variar de uma doença ligeiramente assintomática até uma situação altamente incapacitante⁵. Os isótipos IgG e IgA de ASCA estão presentes em 60% dos casos de diagnóstico de doença de Crohn¹. Os anticorpos ASCA são dirigidos contra fosfopéptidomananos presentes na parede celular de uma levedura (*S. cerevisiae*)⁶. Os anticorpos ASCA podem ser desencadeados por mimetismo molecular e preparação com um antígeno bacteriano ou viral contendo manose, ou uma “molécula auto-antigénica”^{1,7}. Constatou-se que os níveis de ASCA nos casos de doença de Crohn são independentes da actividade e da duração da doença e também do respectivo tratamento⁸. Os anticorpos ASCA ocorrem frequentemente em doentes com doença de Crohn com história familiar positiva. Os anticorpos ASCA não são considerados marcadores específicos da susceptibilidade genética, mas a sua presença é indicadora de uma predisposição genética⁹. Estudos realizados em gémeos monozigóticos e na população judaica indicam uma influência de factores genéticos na patogenia da doença de Crohn¹⁰. O modo de hereditariedade parece ser complexo e heterogéneo com locus candidatos da doença inflamatória intestinal situados nos cromossomas 2, 6, 12 e 16¹¹. Recentemente, foram propostos algoritmos de testes serológicos para diagnosticar a doença inflamatória intestinal e melhorar a distinção entre a doença de Crohn e a colite ulcerosa¹. Resumindo, todos os casos suspeitos de doença inflamatória intestinal têm de ser testados relativamente à presença de ASCA (IgG e IgA).

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste ASCA é realizado como um imunoensaio em fase sólida (ELISA). Os micropoços são revestidos com antígeno de fosfopéptidomanano de *Saccharomyces cerevisiae*; segue-se o bloqueio dos locais não reactivos, visando reduzir a ligação não específica. Os controlos, calibradores e amostras de soros de doentes são incubados nos poços revestidos com antígeno, o que permite a ligação dos anticorpos ASCA presentes no soro. Os anticorpos não ligados e outras proteínas séricas são removidos por lavagem dos micropoços. Os anticorpos

ligados aos micropoços são detectados através da adição aos poços de conjugados de IgG ou IgA anti-humana marcados com enzima. Estes anticorpos conjugados com enzima ligam-se especificamente à imunoglobulina humana da classe certa. O conjugado enzimático não ligado é removido por lavagem. Em seguida, é adicionado aos poços substrato enzimático específico (pNPP), sendo a presença de anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* detectada por uma mudança de cor produzida pela conversão do substrato pNPP. A reacção é interrompida e a intensidade da mudança de cor, proporcional à concentração de anticorpos, é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são expressos em unidades de enzima por mililitro (UE/ml).

REAGENTES

Conservação e preparação

Conserve todos os reagentes a uma temperatura entre 2 e 8 °C. **Não congele.** Não utilize se o reagente não estiver límpido ou se existir algum precipitado. Todos os reagentes têm de estar à temperatura ambiente (20-25 °C) antes de serem utilizados. Desde que conservado a uma temperatura entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído mantém-se estável até ao fim do prazo de validade do kit. Reconstitua o tampão de lavagem com 1 l de água destilada ou desionizada. As tiras de micropoços revestidas destinam-se a ser utilizadas uma única vez.

Precauções

Para diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes obtidos a partir de seres humanos foram testados relativamente à presença de HBsAg, VHC, VIH-1, VIH-2 e HTLV-I, tendo-se obtido resultados negativos em testes exigidos pela FDA. Porém, os derivados de sangue humano e as amostras de doentes devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Siga as boas práticas de laboratório em relação à conservação, distribuição e eliminação destes materiais¹².

ADVERTÊNCIA — A azida de sódio (NaN₃) pode reagir com a canalização de cobre e chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Elimine os líquidos com um grande volume de água para impedir a acumulação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica por ingestão. Em caso de ingestão, avise imediatamente o director do laboratório ou o centro anti-venenos.

Para garantir resultados válidos deve seguir-se com rigor as instruções descritas neste folheto informativo do kit. Não troque componentes do kit com componentes de outras origens que não tenham o mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Empregue boas práticas de laboratório para minimizar a contaminação microbiana e química. Não utilize após o fim do prazo de validade.

Materiais fornecidos

ELISA para Despiste de Anticorpos IgA Anti-*Saccharomyces cerevisiae* ImmuLisa™ **REF** 1156A

ELISA para Despiste de Anticorpos IgG Anti-*Saccharomyces cerevisiae* ImmuLisa™ **REF** 1156G

12 x 8	MICROPLATE ASCA	Microplaca com micropoços individuais destacáveis revestidos com fosfopéptidomanano de <i>S. cerevisiae</i> .
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A ASCA *†	Calibrador A pronto a usar (<i>tampa verde</i>). Soro humano contendo anticorpos para ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B ASCA *†	Calibrador B pronto a usar (<i>tampa violeta</i>). Soro humano contendo anticorpos para ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C ASCA *†	Calibrador C pronto a usar (<i>tampa azul</i>). Soro humano contendo anticorpos para ASCA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D ASCA *†	Calibrador D pronto a usar (<i>tampa amarela</i>). Soro humano contendo anticorpos para ASCA.
1 x 1,5 ml	CONTROL + ASCA *†	Controlo positivo pronto a usar (<i>tampa vermelha</i>). Contém soro humano positivo para ASCA.

PT

1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo pronto a usar (<i>tampa branca</i>). Contém soro humano.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS *†	Conjugado com fosfatase alcalina anti-humano pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Conjugado com fosfatase alcalina anti-humano pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz.
1 x 12 ml	STOP	Solução de paragem pronta a usar.
2 x	BUF WASH	Tampão de lavagem em pó. Reconstituir cada unidade em um litro.

* Contém < 0,1% NaN₃

REF 1156A contém calibradores IgA-ASCA, controlos e conjugado de IgA

REF 1156G contém calibradores IgG-ASCA, controlos e conjugado de IgG

Símbolos utilizados nos rótulos:

LOT Número de lote

REF Número de catálogo

 Prazo de validade

 Temperatura de armazenamento

 Ler as instruções de utilização

IVD Utilização em diagnóstico in vitro

 Fabricante

 Número de testes

Materiais necessários mas não fornecidos

- Pipetas com capacidade para distribuir 5 a 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis
- Tubos de ensaio de 12 x 75 mm, limpos, e respectivo suporte
- Água desionizada ou destilada
- Leitor de microplacas com capacidade para leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver disponível um leitor de microplacas com duplo comprimento de onda, o filtro de referência deve ser definido para 600-650 nm.
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Temporizador
- Papel absorvente
- Dispositivo automático de lavagem de micropipetas com capacidade para distribuir 200 µl

COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só devem ser utilizadas amostras de soro. Amostras muito hemolisadas, lipémicas ou com contaminação microbiana podem interferir com o desempenho do teste e não devem ser utilizadas. Conserve as amostras a uma temperatura entre 2 e 8 °C durante um período não superior a uma semana. Para um período de armazenamento mais prolongado, é necessário congelar as amostras de soro. Evite ciclos repetidos de congelação e descongelação das amostras.

PROCEDIMENTO

Notas sobre o procedimento

- Leia atentamente estas instruções antes de começar o ensaio.
- Coloque os reagentes e as amostras à temperatura ambiente (20–26 °C) durante 30 min. Imediatamente após a utilização, volte a colocar os materiais no frigorífico.
- Prepare todas as diluições das amostras de doentes antes de dar início ao teste.
- **Volte a colocar imediatamente as tiras não usadas na bolsa com dessecante e feche bem para minimizar a exposição a vapor de água.**
- Passo de lavagem: uma boa técnica é fundamental. **Recomenda-se um dispositivo automático de lavagem de microplacas.**
- Utilize uma pipeta multicanal com capacidade para distribuir em simultâneo material para 8 poços. Isto acelera o processo e permite um tempo de incubação mais uniforme.
- É importante controlar cuidadosamente o tempo. Os períodos de incubação começam após a distribuição dos reagentes.

Procedimento de ensaio

1. **TODOS OS REAGENTES TÊM DE ESTAR À TEMPERATURA AMBIENTE (20-26 °C) ANTES DE COMEÇAR O ENSAIO.**
2. Indique na folha do protocolo a posição das amostras na microplaca. Faz parte das boas práticas de laboratório executar os testes das amostras em duplicado.
3. **Determinação qualitativa:** utilize apenas o calibrador D. **Determinação semiquantitativa:** utilize os calibradores A–D como mostrado no exemplo abaixo.



4. Prepare uma diluição a **1:51** da amostra do doente misturando **10 µl** de amostra do doente com **0,5 ml** de diluente de soro.
5. Adicione **100 µl** de calibradores, controlos negativo e positivo e amostra do doente diluída aos micropoços adequados indicados na folha do protocolo.

Nota: inclua também um poço com **100 µl** de diluente de soro como um branco de reagente. Ponha o leitor de ELISA a zero em relação ao branco de reagente. A absorvância deste poço não deve ser superior a 0,3.

6. Incube durante **30 min** (± 5 min) à temperatura ambiente numa superfície plana.
7. Passo de lavagem: aspire totalmente o conteúdo de cada poço. Adicione 200–300 µl de tampão de lavagem **reconstituído** a todos os poços e, em seguida, aspire. Repita mais três vezes esta sequência, num total de quatro lavagens. Inverta e bata ligeiramente com a placa sobre um material absorvente para remover qualquer resíduo de líquido que possa existir depois da última lavagem. Não seque completamente os poços.
8. Adicione 100 µl de conjugado a cada poço.
9. Incube os poços durante **30 min** (± 5 min) à temperatura ambiente.
10. Passo de lavagem: repita o passo 7.
11. Adicione 100 µl de substrato enzimático a cada poço.
12. Incube durante **30 min** (± 5 min) à temperatura ambiente.
13. Adicione 100 µl de solução de paragem a cada poço. Para adição da solução de paragem, mantenha a mesma sequência e tempos usados para o substrato enzimático. Leia a absorvância (DO) de cada poço a 405 nm no prazo de uma hora após ter parado a reacção.
14. Leia a absorvância (DO) de cada poço a 405 nm usando um leitor de microplacas de comprimento de onda único ou simples contra o branco de reagente num valor de absorvância zero.

Controlo de qualidade

Para cada ensaio realizado é necessário executar os calibradores, os controlos positivo e negativo e um branco de reagente para confirmação da integridade e exactidão do teste. A leitura de absorvância do branco de reagente deve ser $< 0,3$. O calibrador A deve ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário, o teste tem de ser repetido. O controlo negativo tem de ser < 20 UE/ml. Se o teste for executado em duplicado, utilize a média das duas leituras para determinar as UE/ml. Durante a execução de determinações qualitativas, a densidade óptica do calibrador D tem de ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. No caso de determinações semiquantitativas, os valores do controlo positivo têm de se situar no intervalo indicado no frasco.

Cálculos

As concentrações das amostras de doentes podem ser determinadas por um de dois métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

$$\frac{\text{Absorv. da amostra de teste}}{\text{Absorv. do calibrador D}} \times \text{UE/ml do calibrador D} = \text{UE/ml da amostra de teste}$$

2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Trace em papel milimétrico linear um gráfico tendo como eixos as absorvâncias dos calibradores A e D e as respectivas concentrações. Represente a concentração em UE/ml no eixo X e a absorvância no eixo Y e desenhe a curva de melhor ajuste linear. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva relacionando-as com os valores de absorvância correspondentes.

Calibrador

Os calibradores prontos a usar são fornecidos para permitir determinações semiquantitativas e têm de ser utilizados em cada execução do ensaio. As amostras de doentes que contenham níveis de anticorpos mais elevados podem produzir valores de absorvância superiores aos do calibrador A. Para determinar os valores semiquantitativos exactos essas amostras de soro devem ser ainda mais diluídas de modo a que os resultados se situem dentro do intervalo da curva de calibração quando forem novamente testadas. Para determinar as UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição. As curvas padrão das amostras são mostradas na parte final deste documento.

Interpretação

A informação indicada constitui apenas um guia para interpretação dos resultados laboratoriais. Os valores representados abaixo foram determinados através de testes de 64 dadores de sangue normais e representam a média dos valores normais mais 3 DP. Cada laboratório deve determinar os seus valores normais.

Valores ASCA UE/ml	Interpretação
IgA ou IgG < 20	Negativo
IgA ou IgG 20–25	Indeterminado
IgA ou IgG > 25	Positivo

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O teste ImmuLisa™ não deve ser executado em amostras muito hemolisadas, com contaminação microbiológica, lipémicas ou ictericas. O método deve ser usado exclusivamente para testar amostras de soro humano. O teste de ambos os isótipos de ASCA é veementemente recomendado. O teste de apenas um dos isótipos pode conduzir a resultados falsos negativos. Um resultado negativo para ASCA não exclui a existência de doença de Crohn. Um resultado negativo para ASCA não exclui a presença de anticorpos ASCA, pois a concentração de anticorpos poderá situar-se abaixo do limite de detecção do ensaio. Além disso, não se pode fazer um diagnóstico baseado exclusivamente nos resultados de ASCA. Os resultados de outras análises laboratoriais e achados clínicos também têm de ser considerados. A presença de complexos imunes ou outros agregados de imunoglobulinas na amostra do doente pode produzir um aumento do nível de ligação não específica e produzir resultados falsos positivos com este ensaio. Os ASCA também podem aparecer em doentes com colite ulcerosa, nos familiares em primeiro grau e em famílias mistas que tenham doença de Crohn e colite ulcerosa^{3,9}. Estão também presentes, embora em menor extensão, em algumas outras doenças autoimunes¹³. O desempenho do ensaio não foi estabelecido para crianças com doença de Crohn e colite ulcerosa.

VALORES ESPERADOS

Os valores esperados para uma população normal são negativos (< 20 EU/ml). Contudo, verificou-se que indivíduos assintomáticos, aparentemente saudáveis, podem apresentar anticorpos ASCA IgA ou IgG⁹. Sugere-se a avaliação combinada de anticorpos ASCA e anticorpos anti-região citoplasmática perinuclear de neutrófilos (pANCA) para todos os casos suspeitos de doença inflamatória intestinal, para aumentar o valor preditivo positivo em comparação com a avaliação individual de casos de doença de Crohn através de ASCA e de casos de colite ulcerosa através de pANCA^{14,15}. Ver tabelas I e II na parte final deste documento.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram testadas amostras de doentes com diagnóstico clínico de doença de Crohn (30 amostras) e colite ulcerosa (30 amostras) em conjunto com soros humanos normais (6 amostras). Os resultados obtidos com os ensaios ELISA anti-ASCA ImmuLisa™ foram:

		ASCA-IgA ImmuLisa™		
		Positivo	Negativo	Total
Doença diagnosticada	DC	12	18	30
	Outra	0	36	36
	Total	12	54	66

Sensibilidade: 40% Especificidade: 100%

		ASCA-IgG ImmuLisa™		
		Positivo	Negativo	Total
Doença diagnosticada	DC	18	12	30
	Outra	6	31	36
	Total	23	43	66

Sensibilidade: 60% Especificidade: 86%

PT

O mesmo grupo de amostras foi usado numa avaliação que comparou o ensaio anti-ASCA (IgG e IgA) ImmuLisa™ com outro ELISA anti-ASCA disponível no mercado. Os resultados são mostrados na tabela III, na parte final deste documento.

Estudo de reactividade cruzada:

Foram testados com o ensaio ImmuLisa™ soros de doentes que apresentavam várias doenças e indivíduos positivos para determinados auto-anticorpos relativamente à presença de ASCA. Os resultados são mostrados na tabela IV, na parte final deste documento.

Precisão:

Foram testados com o ImmuLisa™ três soros diferentes positivos para ASCA, em dez replicados, para determinar a variação intra-ensaio, e foram testados três soros positivos para determinar a variação inter-ensaios. Os resultados são mostrados na tabela V, na parte final deste documento.

Intervalo de apresentação dos resultados:

Foram testadas com o ImmuLisa™ quatro amostras positivas para ASCA com o objectivo de determinar a precisão em intervalos uniformes em todo o intervalo de apresentação de resultados dos ensaios. Os resultados são mostrados na tabela VI, na parte final deste documento.

Recuperação:

Amostras com concentrações de ASCA conhecidas foram misturadas com diluições adequadas de outra amostra positiva com níveis de ASCA conhecidos. Foram determinados os níveis de ASCA das amostras misturadas e a partir desse valores foi calculada a percentagem de recuperação. Os resultados são mostrados na tabela VII, na parte final deste documento.

Estudos clínicos:

Foram testados com o ensaio anti-ASCA (IgG e IgA) ImmuLisa™ 39 casos diagnosticados de doença de Crohn, 38 casos de colite ulcerosa e 12 casos com distúrbios gastrointestinais não relacionados. Os resultados são mostrados na tabela VIII, na parte final deste documento.

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Peeters M, Joossens S, Vermeire S et. al. Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 96: 730-734. 2001.
2. Lindberg E, Lindquist B, Hildebrand H et. al. Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden, 1984-1995. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.* 30:259-264, 2000
3. Seibold F, Stich O, Hufnagl R, Kamil S, Scheurlen M. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in inflammatory bowel disease: A family study. *Scand J Gastroenterol;* 36: 196-20,2001.
4. Saulsbury F.T., Hart. M. Crohn's disease presenting with Henoch-Schonlein purpura. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 31: 173-175, 2000.
5. Pashankar D, Schreiber R.A., Israel. D. M. Perianal Crohn's disease in Infancy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 31: 80-82, 2000.
6. Sutton C.L, Yang H, Li Z, et. al. Familial expression of anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in affected and unaffected relatives of patients with Crohn's disease. *Gut.* 46:5863, 2000.
7. McKay D.M. Bacterial superantigens: Provocateurs of gut dysfunction and inflammation. *Trends Immunol.* 22:497-501, 2001.
8. Hoffenberg, E.J. Fidanza S., Sauaia A. Serologic testing for inflammatory bowel disease. *J. Pediatr.* 134: 447-452, 1999.
9. Annesse V, Andreoli A, Andriulli A, et al. Familial expression of anti-Saccharomyces cerevisiae Mannan antibodies in Crohn's disease and ulcerative colitis: a GISC study.*Am J Gastroenterol Aug;*96:2407-12, 2001.
10. Yang H, McElree C, Roth M-P, et al. Familial empiric risk for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non Jews. *Gut;* 34: 517-24, 1993.
11. Curran ME, Lau KF, Hampe J, et al. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology;* 115: 106671, 1998.
12. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health; (HHS Pub. No. [CDC] 93-8395), 1993.
13. Reddy R.K. Colombel J-F, Poulin D et. al. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in autoimmune liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 96: 252-253, 2001.
14. Quinton. JF, Sendid B, Reumaux D. et. al. Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease:prevelance and diagnostic role. *Gut.* 42:788-79, 1998.
15. Kim BG, Kim YS, Kim JS et al. Diagnostic Role of Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Dis Colon Rectum,* 45: 1062-1069, 2002.
16. Vermeire. S, Joossens. S, Peeters. M. et. al. Comparative study of ASCA (Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody) assays in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 120: 827-833, 2001.
17. Ruemmele FM, Targan SR, Levy G, et al. Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 115(4):822-9, 1998.

Figure I: ASCA Standard Curves

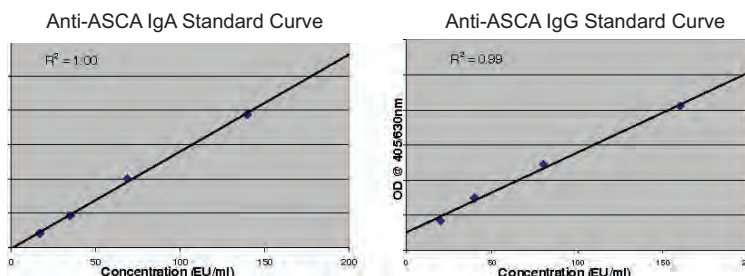


Table I: Diagnostic significance of ASCA and pANCA in IBD¹⁴

	pANCA + PPV %	ASCA + PPV %	ASCA - pANCA + PPV %	pANCA - ASCA + PPV %
Crohn's Disease		89		96
Ulcerative Colitis	74		92.5	

pANCA: atypical pANCA NPV: Negative predictive value PPV: Positive predictive value

Table II: Prevalence of ASCA in Crohn's Disease Versus Other GI Disorders

Study	CD (n)	ASCA Pos. (%)	UC (n)	ASCA Pos (%)	Control (n)	ASCA Pos (%)
Quinton e al ¹⁴	100	61	101	12	163 (healthy) 27 (GI)	0.6 11
Hoffenberg et al ⁸	20	60	25	12	74 (GI & liver)	5
Ruemmele et al ¹⁷	130	55	35	6	78 (GI)	5
Peeters et al ¹	407	60	147	14	157 (healthy) 74 (non-IBD)	3 11
Kim et al ¹⁵	85	49	77	20	20 (healthy)	10

Table III: Immco™ ASCA ELISA vs. Other ELISA

	ASCA IgA		ASCA IgG	
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
ImmuliSA™ ASCA	40	100	60	86
Other ELISA I	52	86	62	82

Table IV: Immco™ ASCA ELISA vs. Other ELISA

Specimen Type	n	IgA Pos	n	IgG Pos
Disease controls	12	3	13	1
ds DNA Antibodies	23	3	23	1
Smooth Muscle Antibodies	22	3	24	3
Immune Complex	21	3	24	1
Rheumatoid Factor	22	3	22	0

Table V: Precision

Positive Sera	IgA		Positive Sera	IgG	
	Intra-assay %CV	Inter-assay %CV		Intra-assay %CV	Inter-assay %CV
1. 167 EU/ml	3.6%	8.2%	1. 170 EU/ml	5.5%	11.5%
2. 129 EU/ml	5.1%	10.5%	2. 140 EU/ml	3.5%	4.6%
3. 108 EU/ml	3.4%	10.3%	3. 116 EU/ml	5.2%	7.4%

Table VI: Reportable Range

	IgA Avg EU/ml	IgA %CV	IgG Avg EU/ml	IgG %CV
Sample 1	172	6.8%	160	4.0%
Sample 2	94	6.0%	72	5.1%
Sample 3	37	7.0%	37	5.6%
Sample 4	10	10.3%	13	10.7%

Table VII: Recovery

	ASCA-IgA Ab. conc. added (EU/ml)	ASCA-IgA Ab. conc. obtained (EU/ml)	% Recovery
Sample 1	129.5	130.2	101
Sample 2	59.8	60.6	101
Sample 3	21.0	22.2	106

	ASCA-IgG Ab. conc. added (EU/ml)	ASCA-IgG Ab. conc. obtained (EU/ml)	% Recovery
Sample 1	130.4	128.4	98
Sample 2	56.5	57.7	102
Sample 3	24.6	26.3	107

Table VIII: Clinical Studies

Clinical Group	n	IgG		IgA		IgG or IgA		IgG and IgA	
		Pos	%	Pos	%	Pos	%	Pos	%
Crohn's Disease	39	24	62%	31	79%	36	92%	19	49%
Ulcerative Colitis	38	1	3%	9	24%	9	24%	1	3%
Controls	12	1	8%	3	25%	3	25%	1	8%



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante

Autorrizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

www.emergogroup.com