



# ImmLiSa™ Anti-*Saccharomyces cerevisiae* Antibody (ASCA) IgA and IgG ELISA

**IVD** For *in vitro* diagnostic use

## PRODUCT INSERT

Catalog No. 1156A/G

48 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 IBD<sup>1</sup>.

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 100,000<sup>2</sup>. 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 specimens<sup>3</sup>. The usual surgical procedures for CD include segmental resection and stricturoplasty<sup>2</sup>. CD can also manifest itself along with other disorders like Henoch-Schonlein purpura<sup>4</sup>. Vasculitis is an uncommon complication of CD, however, few cases have been reported of cutaneous polyarteritis nodosa with CD<sup>4</sup>. A milder form of perianal CD exists and can vary from mild asymptomatic disease to a severe disabling disorder<sup>5</sup>.

ASCA of IgG and IgA isotype are present in 60% of cases with diagnosed CD<sup>1</sup>. The ASCA's are directed against phosphopeptidomannans present in the yeast (*S. cerevisiae*) cell walls<sup>6</sup>. 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"<sup>1,7</sup>. It has been observed that levels of ASCA in CD cases are independent of disease activity, duration and treatment<sup>8</sup>.

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 predisposition<sup>9</sup>. Studies in monozygotic twins and the Jewish population indicates an influence of genetic factors on the pathogenesis of CD<sup>10</sup>. The mode of inheritance seems to be complex and heterogenous, with candidate loci of IBD located on chromosomes 2, 6, 12, and 16<sup>11</sup>.

Recently, serological testing algorithms have been proposed for diagnosis of IBD and to improve discrimination between CD and UC<sup>1</sup>. 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 materials<sup>17</sup>. **WARNING** - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) 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.

Use good laboratory techniques to minimize microbial and chemical contamination. Do not use after expiration date.

### Materials provided

ImmuLisa™ IgA-ASCA ELISA REF 1156A/G

Kits contain sufficient reagents to perform 48 determinations each.

12 x 8	MICROPLATE ASCA	<b>Microplate</b> with individual breakaway microwells coated with <i>S. cereviceae</i> phosphopeptidomannan.
4 x 1.5 ml	CALIBRATOR A-D ASCA IgA <sup>*A</sup>	Ready to use <b>Calibrator A-D</b> ( <i>green cap</i> ). Human serum containing antibodies to ASCA IgA.
4 x 1.5 ml	CALIBRATOR A-D ASCA IgG <sup>*G</sup>	Ready to use <b>Calibrator A-D</b> ( <i>green cap</i> ). Human serum containing antibodies to ASCA IgG.
1 x 1.5 ml	CONTROL+ ASCA IgA <sup>*A</sup>	Ready to use <b>Positive Control</b> ( <i>red cap</i> ). Contains human serum positive for ASCA IgA.
1 x 1.5 ml	CONTROL+ ASCA IgG <sup>*G</sup>	Ready to use <b>Positive Control</b> ( <i>red cap</i> ). Contains human serum positive for ASCA IgG.
1 x 1.5 ml	CONTROL - <sup>*</sup>	Ready to use <b>Negative Control</b> ( <i>white cap</i> ). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS <sup>*A</sup>	Ready to use <b>anti-human Alk. Phos. Conjugate</b> . Color coded pink.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS <sup>*G</sup>	Ready to use <b>anti-human Alk. Phos. Conjugate</b> . Color coded pink.

1 x 60 ml **DIL**\*

Ready to use **Serum Diluent**. Color coded blue.

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 **BUF|WASH**

Powder **Wash Buffer**. Reconstitute to one liter each.

\* Contains < 0.1% NaN<sub>3</sub>

A IgA ELISA component. Use only with other IgA ELISA components.

B IgG ELISA component. Use only with other IgG ELISA components.

### 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.

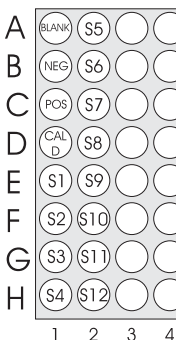
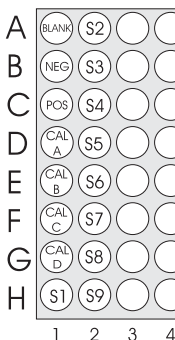
### PROCEDURE

#### Procedural Notes

- Before starting the assay read these instructions carefully.
- Bring all reagents and samples to room temperature (20-25°C) for 30 minutes. Return materials to refrigerator immediately after use.
- 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 (20-25°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.

**QUALITATIVE DETERMINATION****SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION**

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.
10. Wash step: Repeat step 7.
11. Add 100µL of Enzyme Substrate to each well.
12. Incubate for 30 minutes at room temperature.
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 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<sup>3,9</sup>. They are also present to a lesser extent in some other autoimmune diseases<sup>13</sup>. 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 antibodies<sup>9</sup>. Combined evaluation of ASCA and perinuclear anti-

**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%

neutrophil 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<sup>14, 15</sup>. 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:

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.

### 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:



# ImmuLisa™ Anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) Anticuerpo ELISA

IVD

REF 1156A/G 48 determinaciones

ImmuLisa™ ASCA (*S. cerevisiae*) es un ensayo basado en la técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para la detección semi cuantitativa de anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) de clase IgA o IgG en suero humano. La presencia de anticuerpos anti-ASCA IgG puede ser utilizada como ayuda en el diagnóstico de pacientes con la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn (CD).

## Sumario y explicación de la prueba

Las enfermedades inflamatorias del intestino (UC y CD) son desórdenes que remiten crónicos con cursos imprevisibles y respuestas variables a la terapia. La diagnosis de IBD se basa en resultados clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos. Los factores inmunológicos, ambientales, infecciosos (*Yersinia enterocolitica*) y genéticos se han postulado para aumentar el riesgo para desarrollar IBD <sup>1</sup>.

El CD es sobre todo una enfermedad de más viejos niños y de adultos jóvenes y es raro en infancia. Pocos estudios epidemiológicos se han conducido para encontrar la incidencia del CD en la población en general. En la población escandinava solamente, la incidencia de IBD es 7 por 100.000, con el CD en 1.3 por 100.000 <sup>2</sup>. El CD puede afectar cualquier pieza del intestino, y las lesiones son a menudo desiguales y de vez en cuando muy extensas. Histológico, el CD es caracterizado por un inflamatorio transmural infiltra integrado predominante por linfocitos y macrófagos. Los agregados del macrófago se consideran a menudo en especímenes de la biopsia, pero los granulomas bien desarrollados están presentes en los especímenes resecados el solamente 50% <sup>3</sup>. Los procedimientos quirúrgicos generalmente para el CD incluyen la resección segmentaria y stricturoplasty<sup>2</sup>. El CD puede también manifestarse junto con otros desórdenes como la Henoch-Schonlein púrpura <sup>4</sup>. La vasculitis es una complicación infrecuente del CD, sin embargo, pocos casos se han divulgado de polyarteritis nodosa cutáneo con el CD <sup>4</sup>. Una forma más suave de CD perianal existe y puede variar de enfermedad asintomática suave a un desorden que inhabilita severo <sup>5</sup>.

ASCA del isotipo de IgG y de IgA están presentes en el 60% de casos con el CD diagnosticado <sup>1</sup>. Los ASCA's se dirigen contra los phosphopeptidomannans presentes en las paredes de célula de la levadura (*S. cerevisiae*) <sup>6</sup>. ASCA puede ser sacado debido a la mímica y oscurecimiento moleculares por un colmo mannose-que contiene el antígeno bacteriano o viral o "una molécula autoantigénica" <sup>17</sup>. Se ha observado que los niveles de ASCA en casos del CD son independiente de la actividad de la enfermedad, la duración y el tratamiento <sup>8</sup>.

ASCA ocurren con frecuencia en pacientes del CD con historia doméstica positiva. ASCA no se consideran los marcadores específicos de la susceptibilidad genética, pero su presencia indica una predisposición genético <sup>9</sup>. Los estudios en los gemelos monozygóticos y la población judía indican una influencia de factores genéticos en la patogenia del CD <sup>10</sup>. El modo de la herencia se parece ser complejo y heterogéneo, con lugares geométricos del candidato de IBD situado en de los cromosomas 2, 6, 12, y 16 <sup>11</sup>.

Recientemente, los algoritmos de prueba serológicos se han propuesto para la diagnosis de IBD y mejorar la discriminación entre el CD y UC<sup>1</sup>. En resumen, todos los casos sospechados de IBD se deben probar para ASCA (IgG e IgA).

### PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

Los pocillos de la microplaca contienen antígeno *Saccharomyces cerevisiae* phosphopeptidomannan. La microplaca se bloquea para reducir reacciones no específicas. Se añaden controles, calibradores y muestras diluidas en pocillos separados, uniéndose durante la incubación los anticuerpos anti ASCA al antígeno que los recubre. El resto de componentes no unidos se elimina mediante lavado y se añade conjugado anti IgG o IgA humana a cada pocillo. Este la enzima conjugó los anticuerpos ata específicamente a la inmunoglobulina humana de la clase apropiada. Tras un lavado que elimina el conjugado sobrante, se agrega el sustrato enzimático específico (pNPP). Tras incubación la actividad enzimática presente en el pocillo es proporcional a la intensidad de color desarrollado. Se determina la presencia o ausencia de anticuerpos contra la ASCA por medio de la comparación de la densidad óptica de la muestra con la de una curva de calibración de cuatro puntos. Los resultados se dan a conocer de forma semicuantitativa en unidades enzimas (EU/ml).

### REACTIVOS

#### Condiciones de Almacenaje

Guardar todos los reactivos del kit en nevera a 2-8°C. No congelar. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si son almacenados y manipulados correctamente. No utilizar si el reactivo no está claro.

Tampón de lavado: Agregar el agua destilada o desionizada para el volumen del 1L.

Micropocillos: Utilizar una vez solamente.

#### Precauciones

Todo material de origen humano usado en la preparación de los controles para este producto se ha examinado resultando negativo para anticuerpos contra HIV, HbsAg, y HCV por métodos aprobados por la FDA. Ningún método puede sin embargo ofrecer garantía completa que HIV, HBV, HCV o otros agentes contagiosos estén ausentes. Por lo tanto, los reactivos deben manejarse como si fueran material potencialmente contagioso. Dado que se utiliza azida sódica como conservante, este producto puede ser tóxico por ingestión o absorción a través de piel o mucosas. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si se utilizan desagües para la eliminación de reactivos se recomienda lavarlos con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas metálicas.

La sustitución de componentes diferentes de los incluidos en el sistema puede generar resultados inconsistentes.

Utilizar las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química.

No utilizar después de fecha de vencimiento.

ImmuLisa™ IgA-ASCA ELISA **REF** 1156A/G

El kit contiene los suficientes reactivo para realizar 48 determinaciones.

**12 x 8** MICROPLATE|ASCA

Microplaca con los micropocillos disidentes individuales cubrió con el antígeno del ASCA.

**4 x 1.5 ml** CALIBRATOR|A-D|ASCA|IgA<sup>\*A</sup>

Calibrador A-D (*casquillo verde*), listo para uso. Contiene suero humano IgA.

4 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR A-D ASCA IgG</b> * <sup>G</sup>	Calibrador A-D ( <i>casquillo verde</i> ), listo para uso. Contiene suero humano IgG.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + ASCA IgA</b> * <sup>A</sup>	control positivo, listo para uso. ( <i>casquillo rojo</i> ). Contiene suero humano IgA.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + ASCA IgG</b> * <sup>G</sup>	control positivo, listo para uso. ( <i>casquillo rojo</i> ). Contiene suero humano IgG.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	control negativo, listo para uso. ( <i>casquillo blanco</i> ). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	<b>IgA-CONJ ALKPHOS</b> * <sup>A</sup>	conjugado fos. alc. Color de rosa cifrado color.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ ALKPHOS</b> * <sup>G</sup>	conjugado fos. alc. Color de rosa cifrado color.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	tampón de dilución para muestras. Azul cifrado color.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	substrato enzimático. Contiene el pNPP. <b>Proteger contra luz.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	solución de parada
2	<b>BUF WASH</b>	tampón de lavado para 1 litro/vial

\* PRECAUCIÓN - Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub>

A Componente de IgA ELISA. Utilice solamente con otros componentes para IgA ELISA.

G Componente de IgG ELISA. Utilice solamente con otros componentes para IgG ELISA.

#### Material necesario no incluido

- Micropipetas para 5 - 1000µl
- Puntas desechables para micropipeta
- Tubos para dilución de muestras, 4ml
- Agua destilada
- Lector de microplacas capaz de medir densidades ópticas a 405nm
- Botella para tampón de lavado
- Contador de tiempo
- Papel absorbente

#### Recolección de Muestras

Este kit requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras contaminadas, tratadas por calor o que contengan partículas visibles. Deben asimismo evitarse las muestras lipémicas o hemolizadas.

Guardar las muestras a temperatura ambiente no más de 8 horas. Si el ensayo no se va completar en 8 horas, refrigerar la muestra a 2-8°C. Si el ensayo no se va completar entre 48 horas, o para enviar las muestras, congelar a -20°C o a temperatura inferior. Evitar congelar repetido y deshelar.

#### PROCEDIMIENTO

##### Notas Procesales

- Antes comenzando con el análisis leer cuidadosamente el relleno del producto.
- Dejar los especímenes del suero y los reactivos de la prueba equilibrar en la temperatura ambiente antes comenzando con el método de prueba. Volver todos los especímenes y reactivo inusitados al refrigerador inmediatamente después del uso.
- Todas las diluciones de las muestras pacientes se deben preparar antes comenzando con del análisis.

- Quitar requirió tiras del micropocillos de la bolsa y resellan cuidadosamente la bolsa para prevenir la condensación en los pozos inusitados. Volver la bolsa inmediatamente al refrigerador.
- *Lavado: La buena técnica es crítica. Se recomienda una arandela automatizada del microplaca.*
- Utilizar una pipeta de varios canales capaz de entregar 8 pozos simultáneamente. Esto apresura el proceso y preve por un más tiempo uniforme de la incubación.
- Para todos los pasos, el control cuidadoso de la sincronización es importante. El comienzo de todos los períodos de la incubación comienza con la terminación de la adición el reactivo.

## Metodología

1. Llevar todos reactivos y muestras a la temperatura ambiente.
2. Indicar la colocación del espécimen en la página del protocolo. Es buena práctica del laboratorio funcionar muestras en duplicado.
3. Determinación cualitativo: Utilizar solamente el calibrador D.  
Determinación semi cuantative: Utilizar calibradores A a D según lo representado en la disposición de la muestra abajo.

### Determinación cualitativo

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 cuantative

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. Preparar una dilución 1:51 de cada muestra a procesar añadiendo 10 µl de muestra a 0.5 ml de tampón de dilución para muestras.
5. Agregar 100 µl de los controles, de calibradores, de y las muestras pacientes diluidas a los micropocillos apropiados según protocolo cubre.  
**Nota:** Incluir un pozo que contenga 100 µl del tampón de dilución para muestras como espacio en blanco el reactivo. Poner a cero a lector de ELISA contra el espacio en blanco el reactivo.
6. Incubar 30 minutos (± 5 minutos) en la temperatura ambiente.
7. Lavado (4x): Aspirar el contenido de cada pocillo. Agregar 200-300µl de solución de lavado a todos pocillos y aspirar. Para el lavado manual, llenar cada micropocillos del almacenador intermedio reconstituido de la colada. Desechar el líquido invirtiendo y golpeando ligeramente fuera del contenido de cada uno el pozo o aspirando el líquido de cada uno bien. Para borrar en el extremo de la colada pasada, de las tiras invertidas y golpear ligeramente los pozos vigoroso en las toallas de papel absorbentes. Para las arandelas automáticas, programar la arandela según las instrucciones del fabricante.
8. Agregar 100 µl de conjugado en micropocillos.

9. Incubar **30 minutos** ( $\pm$  5 minutos) en la temperatura ambiente.
10. Lavado: Todos los micropocillos como en 7.
11. Agregar 100  $\mu$ l de substrato enzimático en cada micropocillos en la misma orden y la sincronización que para el conjugado.
12. Incubar **30 minutos** ( $\pm$  5 minutos) en la temperatura ambiente.
13. Agregar 100  $\mu$ l de solución de parada en cada micropocillos usando la misma orden y midiendo el tiempo que para la adición del substrato enzimático. Leer los valores de la absorbancia en el plazo de 1 hora de agregar solución de parada.
14. Leer la absorbancia (OD) de cada pocillo a 405nm en un plazo máximo de una hora. Si se desea seguir el método de lectura bicromática puede utilizarse 620 nm como longitud de onda de referencia.

## RESULTADOS

### Cálculo de Resultados

Las concentraciones de las muestras pacientes se pueden determinar por cualquiera de dos métodos:

#### 1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

$$\frac{\text{OD Espécimen}}{\text{OD Calibradore D}} \times \text{EU/ml de Calibradore D} = \text{EU/ml Espécimen}$$

#### 2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTATIVE

Absorbancia del diagrama de Calibradore A a D contra su concentración respectiva en un papel de gráfico lineal-lineal. Trazar la concentración en EU/ ml en el X-eje contra la absorbancia en el Y-eje y dibujar la mejor curva apta. Determinar las concentraciones de las muestras pacientes de la curva contra su valor correspondiente de la absorbancia.

#### Calibrador

Los calibradores se incluyen para proporcionar semi - cuantificación y se deben utilizar con cada prueba. Los especímenes pacientes que contienen niveles más altos del anticuerpo pueden dar los valores de la absorbancia mayores que el del Calibradore A. Para que determina valores semi-cuantative exactos tales especímenes debe ser diluido más a fondo así que bajan dentro de la gama de la curva del calibrador cuando están reexaminados. Para determinación EU/ ml, multiplicar las unidades obtenidas por el factor de la dilución.

#### Interpretación

La información siguiente sirve solamente como guía en la interpretación de los resultados del laboratorio. Cada laboratorio debe determinar sus propios valores normales.

Anti-ASCA (EU/ml)	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação

IgA o IgG <20	Neg (-)
IgA o IgG 20-25	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
IgA o IgG >25	Pos (+)

#### Limitaciones

Este kit requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras contaminadas, tratadas por calor o que contengan partículas visibles. Deben asimismo evitarse las muestras lipémicas o hemolizadas.

La prueba para ambos isotipos de ASCA se recomienda fuertemente. La prueba para solamente uno y no ambas pueden conducir a los resultados negativos falsos. Un resultado negativo de ASCA no elimina la presencia de la enfermedad de Crohn. Un

resultado negativo del anticuerpo de ASCA no elimina la presencia de los anticuerpos de ASCA, porque la concentración del anticuerpo puede estar debajo del límite de detección del análisis. Además, una diagnosis no se puede hacer en base de resultados de ASCA sola. Los resultados de otros pruebas de laboratorio y resultados clínicos deben también ser considerados. La presencia de complejos inmunes o de otros agregados de la inmunoglobulina en la muestra paciente puede causar un nivel creciente del atascamiento no específico y producir positivos falsos en este análisis. ASCA también ocurren en pacientes con UC, sus primeros parientes del grado y familias mezcladas con el CD y UC<sup>3,9</sup>. Están también presentes en un grado inferior en algunas otras enfermedades autoinmunes<sup>13</sup>. El funcionamiento del análisis no se ha establecido para el CD pediátrico y los pacientes UC.

**VALORES PREVISTOS**

Los valores previstos en una población normal son negativos (< 20 EU/ml). Sin embargo, se ha determinado que algunos individuos al parecer sanos, asintomáticos pueden probar el positivo para los anticuerpos de IgA o de IgG ASCA<sup>9</sup>. La evaluación combinada de ASCA y del anticuerpo del anti-neutrophil citoplásmico perinuclear (pANCA) para todos los casos sospechados de IBD se sugiere, para aumentar el valor profético positivo en la comparación al gravamen individual de los casos del CD en los casos de ASCA y de UC en pANCA<sup>14, 15</sup>. Ver la tabla 1 y la tabla II en el extremo de este documento.

**CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL FUNCIONAMIENTO**

Las muestras de pacientes con la diagnosis clínica del CD (30 especímenes) y UC (30 especímenes) fueron probadas junto con los sueros humanos normales (6 especímenes). Los resultados obtenidos con los análisis de ImmuLisa anti-ASCA ELISA siguen:

		<b>IMMCO anti-ASCA IgA</b>		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
<b>CD Pos (+)</b>	POS (+)	12	18	30
<b>Otro</b>	NEG (-)	0	36	36
<b>Total</b>	TOT (=)	12	54	66

relative specificity/specificitate relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificitate relativa/especificidade relativa: 40%  
 relative sensitivity/sensibilitate relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivitat/sensibilitate relativa/sensibilidade relativa: 100%

		<b>IMMCO anti-ASCA IgA</b>		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
<b>CD Pos (+)</b>	POS (+)	18	12	30
<b>Otro</b>	NEG (-)	6	31	36
<b>Total</b>	TOT (=)	23	43	66

relative specificity/specificitate relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificitate relativa/especificidade relativa: 60%  
 relative sensitivity/sensibilitate relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivitat/sensibilitate relativa/sensibilidade relativa: 86%

**Precisión:**

El mismo sistema de la muestra fue utilizado en una evaluación comparativo del ASCA ImmuLisa™ (IgG e IgA) contra otro ELISA disponible en el comercio de ASCA. Los resultados se representan en la tabla III en el extremo de este documento.

**Estudio Cruzado De la Reactividad:**

Los sueros de los pacientes que sufrían de varias condiciones y de individuos positivos para ciertos autoanticuerpos fueron probados para ASCA con el análisis de ImmuLisa. Los resultados aparecen en la tabla IV en el extremo de este documento.

**Precisión:**

En diez réplicas, tres diversos sueros positivos de ASCA fueron probados con el ImmuLisa para determinar la variación del intra-análisis, y tres sueros positivos fueron probados para determinar la variación del inter-análisis. Los resultados aparecen en la tabla V en el extremo de este documento.

**Gama Denunciable:**

Cuatro muestras positivas de ASCA fueron probadas con el ImmuLisa para determinar la precisión en los intervalos uniformes a través de la gama denunciada de los análisis. Los resultados aparecen en la tabla VI en el extremo de este documento.

**Recuperación:**

Las muestras con concentraciones sabidas de ASCA fueron mezcladas con diluciones apropiadas de otra muestra positiva con cantidades sabidas de ASCA. Los niveles de ASCA de las muestras mezcladas fueron determinados y de los valores obtuvo la recuperación de los por ciento calculada. Los resultados aparecen en la tabla VII en el extremo de este documento.

**Estudios Clínicos:**

39 diagnosticaron las cajas de la enfermedad de Crohn, 38 casos del UC y 12 casos con disturbios gastrointestinales sin relación fueron probados en ImmuLisa™ ASCA IgG e IgA. Results en la tabla VIII en el extremo de este documento.



**IMMCO**  
**DIAGNOSTICS**

**ImmuLisa™**  
**Anticorpi Anti-Saccharomyces**  
**cerevisiae (ASCA) IgA e IgG**  
**ELISA**

**IVD**

**REF** Ref. N. 1156A/G 48 Determinazioni

### USO PREVISTO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione semi-quantitativa di anticorpi anti-*Saccharomyces cerevisiae* (IgG o IgA) nel siero umano di pazienti con una Malattia Infiammatoria Intestinale (IBD) da usarsi quale ausilio nella diagnosi del Morbo di Crohn (CD).

### RIEPILOGO

Le Malattie Infiammatorie Intestinali - la Colite Ulcerativa (UC) e il Morbo di Crohn (CD) - sono disturbi con andamento cronico e remittente e con decorsi imprevedibili e risposte diverse alle terapie. La diagnosi delle IBD si basa su un vasto quadro clinico, radiologico, endoscopico e istologico. Sono stati presupposti fattori immunologici, ambientali, infettivi (*Yersinia enterocolitica*) e genetici per poter considerare un maggior rischio di sviluppo di una delle IBD<sup>1</sup>.

Il Morbo di Crohn è una patologia che si manifesta principalmente in adolescenti e giovani adulti, mentre è rara durante l'infanzia. Sono stati condotti alcuni studi epidemiologici per calcolare l'incidenza del Morbo di Crohn in una popolazione generale. Considerando solo la popolazione scandinava, l'incidenza di una delle forme di IBD è pari a 7 su 100.000, e quella del Morbo di Crohn in particolare è 1,3 su 100.000<sup>2</sup>. Il Morbo di Crohn può colpire qualsiasi parte dell'intestino; le lesioni e le infiammazioni provocate sono spesso asimmetriche e in alcuni casi molto estese in profondità. Dal punto di vista istologico, il Morbo di Crohn si caratterizza per un infiltrato infiammatorio trasmurale composto principalmente da linfociti e macrofagi. Gli aggregati dei macrofagi sono spesso visibili nei campioni sottoposti a biopsia, ma granulomi ben sviluppati sono presenti solo nel 50% dei campioni resecati<sup>3</sup>. Tra le procedure chirurgiche più utilizzate per asportare le lesioni causate dal Morbo di Crohn sono la resezione segmentale e la stricturoplastica<sup>2</sup>. Il Morbo di Crohn si può manifestare anche in concomitanza con altri disturbi come la Henoch-Schonlein purpura<sup>4</sup>. La vasculite è una complicazione poco comune del Morbo di Crohn, tuttavia sono stati registrati alcuni casi di poliartrite nodosa cutanea con il Morbo stesso<sup>4</sup>. Esiste anche una forma più lieve del Morbo di Crohn perianale, la quale può variare da lievi patologie asintomatiche a gravi disturbi disabilitanti<sup>5</sup>.

Gli ASCA di classe IgG e IgA sono presenti nel 60% dei casi di Morbo di Crohn diagnosticati<sup>1</sup>. Gli ASCA sono diretti contro le sequenze di mannosio che compongono il mannano della parete cellulare del lievito (*S. cerevisiae*)<sup>6</sup>. Si potrebbe dedurre la presenza di ASCA a causa di mimetismo molecolare e da uno studio affrettato degli antigeni batterici o virali ad alto contenuto di mannosio oppure da una "molecola autoantigenica"<sup>1,7</sup>. Si è osservato che i livelli di ASCA nei casi di Morbo di Crohn sono indipendenti dall'andamento della patologia, dalla durata e dal trattamento<sup>8</sup>.

Gli ASCA sono spesso presenti in pazienti affetti dal Morbo di Crohn con un'anamnesi familiare positiva. Gli ASCA non sono considerati un marker specifico per stabilire un'eredità genetica, ma la loro presenza sta a indicare una predisposizione genetica<sup>9</sup>. Gli studi effettuati sui gemelli monozigoti e sulla popolazione ebraica riportano un'influenza dei

fattori genetici sulla patogenesi del Morbo di Crohn<sup>10</sup>. Le modalità di eredità genetica risultano complesse ed eterogenee, con loci delle IBD situati sui cromosomi 2, 6, 12, e 16<sup>11</sup>. Data la sintomatologia molto simile delle due forme principali di IBD, recentemente sono stati proposti dei test sierologici con relativi algoritmi per una diagnosi meno problematica delle IBD e una distinzione più chiara tra il Morbo di Crohn e la Colite Ulcerativa<sup>1</sup>. Ricapitolando, tutti i casi ritenuti sospetto di IBD devono essere esaminati a ASCA (IgG ed IgA).

## REAGENTI

### Condizioni di conservazione

Conservare tutti i reagenti del kit a 2-8°C. Non congelare. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.

Non usare se il reagente non è chiaro.

Tampone di lavaggio: Aggiungere l'acqua distillata o deionizzata per il volume del 1L.

Microstrips: Usare una volta soltanto.

### Precauzioni

Tutte le fonti umane di materiali usati nella preparazione dei controlli per questo prodotto sono state testate e sono risultate negative per la presenza di anticorpi anti-HIV, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV mediante metodi approvati dall'FDA. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

La sodio azide è usata come conservante. La sodio azide è un veleno e può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Lasciar scorrere grandi quantità di acqua, se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, per prevenire la formazione di azidi.

La sostituzione di componenti diversi da quelli forniti nel kit può causare risultati non attendibili. Usare le buone tecniche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare dopo la data di scadenza.

### Materiali forniti

ImmLisa™ IgA/IgG-ASCA ELISA **REF** 1156A/G

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 48 determinazioni ciascuno.

12 x 8	<b>MICROPLATE ASCA</b>	microstrips da 96 pozzetti individuali con antigene ASCA
4 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR A-D ASCA IgA</b> * <sup>A</sup>	calibratore A-D (protezione verde), pronto al uso, contiene siero umano IgA.
4 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR A-D ASCA IgG</b> * <sup>G</sup>	calibratore A-D (protezione verde), pronto al uso, contiene siero umano IgG.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + ASCA IgA</b> * <sup>A</sup>	controllo positivo (protezione rossa), pronto al uso, contiene siero umano IgA.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + ASCA IgG</b> * <sup>G</sup>	controllo positivo (protezione rossa), pronto al uso, contiene siero umano IgG.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> * <sup>*</sup>	controllo negativo (protezione bianca), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 12 ml	<b>IgA-CONJ ALKPHOS</b> * <sup>A</sup>	coniugato fos. alc. Colore rosa codificato colore.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ ALKPHOS</b> * <sup>G</sup>	coniugato fos. alc. Colore rosa codificato colore.

1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	diluyente per campioni. Colorare l'azzurro codificato.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	substrato enzimatico. Contiene il pNPP. <b>Proteggere da luce.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	soluzione bloccante
2	<b>BUF WASH</b>	tampone di lavaggio per 1 litro/fiala

\* Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub>

A Componente di IgA ELISA. Usi soltanto con altre componenti per IgA ELISA.

G Componente di IgG ELISA. Usi soltanto con altre componenti per IgG ELISA.

### Materiali richiesti ma non forniti

- Micropipette in grado di erogare volume di 5 – 1000 µL
- Puntali monouso per micropipette
- Provette per la diluizione dei sieri, volume 4mL
- Acqua distillata o deionizzata
- Lettore per piastre ELISA in grado di leggere a 405nm
- Bottiglia per tampone di lavaggio
- Temporizzatore
- Carta assorbente

### Raccolta dei campioni

Questa tecnica deve essere usata con un campione di siero. Campioni con segni di contaminazione microbica, trattati con calore o contenenti particelle visibili non dovrebbero essere usati. Si dovrebbe evitare anche l'uso di sieri fortemente emolizzati o lipemici.

Conservare i campioni a temperatura ambiente per non più di 8 ore. Se il test non può essere eseguito entro 8 ore, conservare i campioni in frigorifero a 2-8°C. Se il test non può essere eseguito entro 48 ore, oppure per la spedizione dei campioni, congelare a -20°C. Evitare il congelamento ripetuto e lo scioglimento.

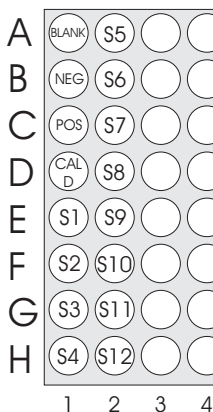
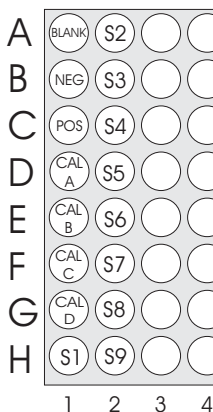
### METODICA

#### Prima di incominciare

- Prima di cominciare l'analisi ha letto con attenzione queste istruzioni.
- Portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (20-25°C) per 30 minuti. Materiali di ritorno al frigorifero subito dopo di uso.
- Preparare tutte le diluizioni degli esemplari pazienti prima di iniziare la prova.
- **Rimettere immediatamente la strisce inutilizzate nella busta contenente il materiale essicante e sigillarla bene per minimizzare l'esposizione all'umidità ambientale.**
- Lavaggio: La buona tecnica è critica. Una rondella automatizzata del piastra microtiter ELISA è suggerita.
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di trasporto delle 8 posizioni simultaneamente. Ciò accelera il processo e provvede ad un più tempo di incubazione dell'uniforme.
- La sincronizzazione attenta è importante. I periodi di incubazione cominciano dopo l'erogazione del reagentes.

#### Esecuzione del test

1. **TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-25°C) PRIMA DI INIZIARE IL TEST.**
2. Usare l'annotazione di protocollo per notare la posizione degli esemplari nel piastra microtiter. È buona pratica del laboratorio verificare gli esemplari due volte.
3. **Determinazione qualitativa:** usare soltanto Calibratore D.  
**Determinazione semi-quantitativa:** usare Calibratori A - D come indicato nell'esempio qui sotto.

**Determinazione qualitativa:****Determinazione semi-quantitativa:**

4. Preparare una diluzione di **1:51** dei campioni mescolando **10 µl** dei campioni con **0.5 ml** di diluente per campioni.
5. Distribuire 100 µL di ciascuno dei calibratori, dei campioni diluiti, del Controllo Negativo e del Controllo Positivo nei pozzetti corrispondenti.

**Nota:** Includere una posizione con **100 µl** del diluente per campioni come spazio in bianco del reagente. Il valore zero del lettore del piastra microtiter dovrebbe essere regolato usando questa posizione. La capacità di assorbimento di questo pozzetto non dovrebbe essere più grande di 0.3.

6. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente su una superficie piana.
7. Lavaggio: Aspirare completamente il contenuto di ciascun pozzetto. Distribuire 200-300µL di soluzione di lavaggio in tutti i pozzetti e quindi aspirarla. Ripetere questa operazione per altre tre volte, per un totale di quattro lavaggi. Dopo l'ultimo lavaggio capovolgere la piastra e scuoterla fermamente su tovaglioli di carta assorbente per rimuovere eventuali residui di liquido. Non asciugarsi pozzetti completamente.
8. Distribuire 100µL di Coniugato in ciascun pozzetto.
9. Incubare i pozzetti per 30 minuti.
10. Lavaggio: Ripetere la procedura descritta al punto 7.
11. Distribuire 100µL di substrato enzimatico in ciascun pozzetto
12. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
13. Distribuire 100µL di soluzione bloccante in ogni pozzetto. Per l'aggiunta della soluzione bloccante mantenere la stessa sequenza e gli stessi tempi utilizzati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza (OD) entro 1 ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.
14. Leggere l'assorbanza (OD) di ciascun pozzetto a 405nm usando un singolo o lettore doppio del piastra microtiter di lunghezza d'onda contro l'insieme in bianco del reagente alla capacità di assorbimento zero.

**Controllo di qualità**

I calibratori, controllo positivo e controllo negativo e uno spazio in bianco devono essere fatti funzionare con ogni analisi per verificare l'integrità e l'esattezza della prova. La lettura di capacità di assorbimento dello spazio in bianco dovrebbe essere < 0.3. Il calibratore A dovrebbe avere un OD di 1.0, altrimenti la prova deve essere ripetuta. Il controllo negativo deve essere < 20 EU/ml. Se la prova è funzionata due volte, la media delle due letture dovrebbe essere presa per EU/ml di determinazione. Mentre realizza le determinazioni qualitative, il OD di calibratore D deve essere più grande di quello del controllo negativo e di di meno che il OD del controllo positivo. Per le determinazioni semiquantitativa il controllo positivo deve avere valori nella gamma stampata sulla fiala.

## RISULTATI

### Calcolo dei risultati

Le concentrazioni dei campioni pazienti possono essere determinate da uno di due metodi:

#### 1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

OD di Esempiare

X EU/ml de Calibratore D = EU/ml di Esempiare

OD di Calibratore D

#### 2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Capacità di assorbimento del diagramma di calibratores da A a D contro la loro concentrazione rispettiva su una carta da grafico lineare-lineare. Tracciare la concentrazione EU / ml sull'X-asse contro la capacità di assorbimento sull'Y-asse e disegnare la curva adatta migliore. Determinare le concentrazioni dei campioni pazienti dalla curva contro il relativo valore corrispondente di capacità di assorbanza.

#### **Calibratore**

I calibratori sono inclusi per fornire semi - la quantificazione e devono essere usati con ogni prova. Gli esemplari pazienti che contengono i livelli elevati dell'anticorpo possono dare i valori di capacità di assorbanza più grandi di quello del calibratore A. Per che determina i valori semiquantitativi esatti tali esemplari dovrebbe più ulteriormente essere diluito in modo da fanno parte della gamma della curva del calibratore una volta riprovati. Per determinazione EU/ ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

#### **Interpretazione**

Le seguenti informazioni servono soltanto da guida nell'interpretazione dei risultati del laboratorio. Ogni laboratorio deve determinare i relativi propri valori normali.

ASCA (EU/ml)	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação

IgG <20	Neg (-)
IgG 20-25	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
IgG >25	Pos (+)

IgA <20	Neg (-)
IgA 20-25	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
IgA >25	Pos (+)

#### **LIMITI DELLA PROCEDURA**

Il Test ImmuLisa™ non deve essere eseguito su campioni fortemente emolizzati, contaminati, lipemici o itterici. Per questo metodo utilizzare solo campioni di siero umano.

Si consiglia fortemente di eseguire il test per entrambi gli isotipi degli anticorpi anti-saccharomyces cerevisiae in quanto effettuare il test per un solo isotipo potrebbe condurre a risultati falso-negativi. Un risultato negativo del test per gli ASCA non esclude la presenza del Morbo di Crohn. Un risultato negativo del test per gli ASCA non esclude la presenza di anticorpi anti-saccharomyces cerevisiae in quanto è possibile rilevare una concentrazione di anticorpi al di sotto del limite di rilevazione del test. Inoltre, non è possibile procedere a una diagnosi basandosi solo sui risultati relativi agli anticorpi anti-saccharomyces cerevisiae. E' necessario valutare anche i risultati di altri test di laboratorio e il quadro clinico del paziente. La presenza di immunocomplessi o di altri aggregati di immunoglobuline nel campione del paziente potrebbe portare a un aumento del livello di legami non specifici e il test potrebbe dare risultati falso-positivi. Gli ASCA si manifestano anche in pazienti affetti da Colite Ulcerativa, nei loro parenti di primo grado e nelle famiglie miste colpite dal Morbo di Crohn e dalla Colite Ulcerativa<sup>3,9</sup>. Si rilevano anche, in minor misura, in presenza di altri

disturbi autoimmuni<sup>13</sup>. La prestazione del test non è stata stabilita per il Morbo di Crohn ad esordio pediatrico e per i pazienti affetti da Colite Ulcerativa.

### **VALORI ATTESI**

I valori attesi in una popolazione normale sono negativi (<20 EU/ml). Tuttavia, è stato rilevato che alcuni individui asintomatici e apparentemente in salute potrebbero risultare positivi al test per gli anticorpi anti-saccharomyces cerevisiae IgA o IgG<sup>9</sup>. Si consiglia una valutazione combinata degli ASCA e degli anticorpi anti-neutrofili citoplasmatici (pANCA) per tutti i casi sospetti di IBD, in modo da aumentare il valore predittivo positivo a comparazione della singola valutazione dei casi di Morbo di Crohn mediante gli anticorpi anti-saccharomyces cerevisiae e dei casi di Colite Ulcerativa mediante gli anticorpi anti-neutrofili citoplasmatici.<sup>14, 15</sup>. Vedi Tabelle I e II alla fine della metodica.

### **CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL METODO**

Sono stati analizzati i campioni di pazienti diagnosticati come affetti da Morbo di Crohn (30 campioni) e da Colite Ulcerativa (30 campioni) con normali sieri umani (6 campioni). I risultati ottenuti con il test ImmuLisa™ ASCA ELISA sono i seguenti:

Lo stesso set di campioni è stato usato in una valutazione comparativa: il test ASCA ImmuLisa™ (IgG e IgA) è stato confrontato con un altro test contro ASCA ELISA disponibile in commercio. I risultati sono riportati nella tabella III alla fine della metodica.

### **Studio delle Reazioni Crociate:**

Sono stati analizzati con il test ImmuLisa i sieri dei pazienti affetti da vari disturbi e individui positivi ad alcuni autoanticorpi per la determinazione degli anticorpi anti-S.cerevisiae. I risultati compaiono nella tabella IV alla fine della metodica.

### **Precisione:**

Sono stati analizzati con il test ImmuLisa tre diversi sieri positivi agli anticorpi anti-S.cerevisiae per un totale di 10 volte ciascuno per determinarne la variazione intra-seduta, mentre altri tre sieri positivi sono stati analizzati per determinare la variazione inter-seduta. I risultati sono riportati nella tabella V alla fine della metodica.

### **Range Riportabile:**

Procedendo, con il test ImmuLisa, all'analisi di quattro campioni positivi agli anticorpi anti-S.cerevisiae, è stato possibile determinare la precisione del test a intervalli regolari. I risultati sono riportati nella tabella VI alla fine della metodica.

### **Integrazione:**

Dei campioni con concentrazioni conosciute di anticorpi ASCA sono stati miscelati con le appropriate diluizioni di un altro campione positivo con quantità note di ASCA. Sono stati poi determinati i livelli dei campioni misti e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di integrazione. I risultati compaiono nella tabella VII alla fine della metodica.

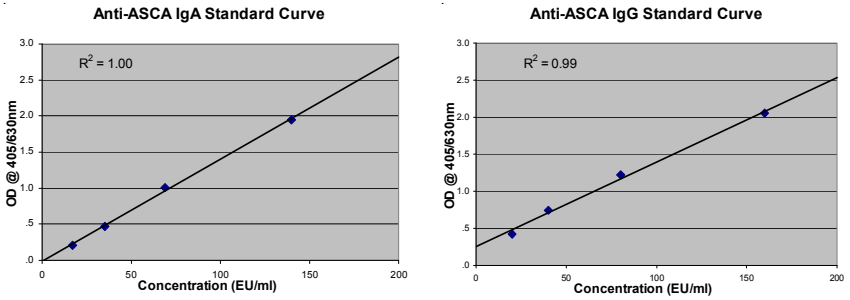
### **Studi Clinici:**

Sono stati analizzati, con il test ImmuLisa™ ASCA IgG e IgA 39 casi diagnosticati di Morbo di Crohn, 38 casi di Colite Ulcerativa e 12 casi con disturbi gastrointestinali indipendenti gli uni dagli altri. I risultati sono riportati nella tabella VIII alla fine della metodica.

## **REFERENCES•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI**

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.* 46:58-63, 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. Annese 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: 1066-71, 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: prevalence 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. Ruummele 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 IBD<sup>14</sup>**

	pANCA + PPV %	ASCA + PPV %	ASCA - pANCA + PPV %	pANCA - ASCA + PPV %
<b>Crohn's Disease</b>		89		96
<b>Ulcerative Colitis</b>	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 <sup>14</sup>	100	61	101	12	163 (healthy) 27 (GI)	0.6 11
Hoffenberg et al <sup>8</sup>	20	60	25	12	74 (GI & liver)	5
Ruemmele et al <sup>17</sup>	130	55	35	6	78 (GI)	5
Peeters et al <sup>1</sup>	407	60	147	14	157 (healthy) 74(non-IBD)	3 11
Kim et al <sup>15</sup>	85	49	77	20	20 (healthy)	10

**Table III: IMMCO ASCA ELISA vs. Other ELISA**

	ASCA IgA		ASCA IgG	
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
<b>ImmuLisa ASCA</b>	40	100	60	86
<b>Other ELISA I</b>	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		IgG	
	Avg EU/ml	%CV	Avg EU/ml	%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		% Recovery
	Ab. conc. added (EU/ml)	Ab. conc. obtained (EU/ml)	
Sample 1	129.5	130.2	101
Sample 2	59.8	60.6	101
Sample 3	21.0	22.2	106

	ASCA-IgG		% Recovery
	Ab. conc. added (EU/ml)	Ab. conc. obtained (EU/ml)	
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**

**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](mailto:info@immco.com)**

*or your local product distributor*



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante

Autorizzato/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](http://www.emergogroup.com)