



## Instructions for Use

# ASCA IgA ELISA



**REF** EIA-4279

 **96**



**DRG Instruments GmbH**, Germany  
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

**Distributed by:**



**DRG International, Inc.**, USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.**

### Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED PURPOSE .....	3
2	DIAGNOSTIC RELEVANCE .....	3
3	TEST PRINCIPLE .....	3
4	TEST COMPONENTS .....	4
5	MATERIALS REQUIRED IN ADDITION .....	4
6	STORAGE AND STABILITY .....	4
7	GENERAL INFORMATION .....	5
8	PREPARATION.....	5
9	TEST PERFORMANCE .....	6
10	TEST EVALUATION .....	7
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	7
12	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	8
13	DISPOSAL .....	8
14	REFERENCES.....	8
1	ZWECKBESTIMMUNG .....	9
2	DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG .....	9
3	TESTPRINZIP .....	9
4	TESTKOMPONENTEN .....	10
5	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL .....	10
6	LAGERUNG UND HALTBARKEIT .....	10
7	ALLGEMEINE HINWEISE.....	11
8	VORBEREITUNG.....	11
9	DURCHFÜHRUNG .....	12
10	AUSWERTUNG .....	13
11	LEISTUNGSMERKMALE.....	13
12	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN .....	14
13	ENTSORGUNG.....	14
14	REFERENZEN .....	14
1	DESTINAZIONE D'USO.....	15
2	RILEVANZA DIAGNOSTICA.....	15
3	PRINCIPIO DEL SAGGIO.....	15
4	COMPONENTI DEL SAGGIO.....	16
5	MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO .....	16
6	CONSERVAZIONE E STABILITÀ .....	16
7	INFORMAZIONI GENERALI .....	17
8	PREPARAZIONE .....	17
9	PRESTAZIONI DEL SAGGIO .....	18
10	VALUTAZIONE DEL SAGGI .....	19
11	CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI.....	19
12	AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	20
13	SMALTIMENTO .....	20
14	RIFERIMENTI .....	20

1	USO PREVISTO .....	21
2	RELEVANCIA DEL DIAGNÓSTICO.....	21
3	PRINCIPIO DE LA PRUEBA.....	21
4	COMPONENTES DE LA PRUEBA .....	22
5	MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROPORCIONADOS.....	22
6	ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD .....	22
7	INFORMACIÓN GENERAL.....	23
8	PREPARACIÓN .....	23
9	RENDIMIENTO DE LA PRUEBA .....	24
10	EVALUACIÓN DE LA PRUEBA .....	25
11	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO.....	25
12	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES .....	26
13	DESECHO .....	26
14	REFERENCIAS.....	26
	SYMBOLS USED.....	27

## 1 INTENDED PURPOSE

The ASCA IgA ELISA is a quantitative immunoassay for the determination of IgA antibodies against *Saccharomyces cerevisiae* in human serum.

The ASCA IgA ELISA is intended as an aid in the diagnosis of Crohn's disease in conjunction with other clinical and laboratory findings.

The immunoassay is designed for manual professional in vitro diagnostic use.

## 2 DIAGNOSTIC RELEVANCE

Non-specific inflammatory bowel diseases including Crohn's disease (Enteritis regionalis) and ulcerative colitis (UC) are characterized by unknown etiology as well as chronic-remitting inflammatory processes of the intestine. Whereas the inflammation of ulcerative colitis is restricted to the mucosa and submucosa of colon and rectum, Crohn's disease (CD) shows a wide spread inflammation of the gastro-intestinal tract with granuloma formation.

The risk developing one of these diseases is strongly influenced by immunologic, genetic, infectious and environmental factors.

The differential diagnosis of inflammatory bowel diseases to chronic diarrhea, recurrent abdominal dolor, infectious colitis, anorexia as well as the differentiation of CD to ulcerative colitis is still a high challenge.

The determination of IgA and IgG antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) has been described as one important serological marker for the differential diagnosis of Crohn's disease recently. Up to 70 % of patients with CD show antibody levels to *Saccharomyces cerevisiae*. Although the cause for their occurrence has been unclear, antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) are strongly associated with inflammatory processes of the intestine.

In combination with the detection of autoantibodies to atypical anti-neutrophil cytoplasmic antigens (aANCA) which are mainly found in patients with ulcerative colitis, ASCA are a valid parameter for the differentiation of Crohn's disease and ulcerative colitis.

## 3 TEST PRINCIPLE

The ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) is an immunoassay for the determination of specific antibodies. The strips of the microtiter plate are coated with test-specific antigens. If antibodies are present in the patient's sample, they bind to the antigens. A secondary antibody conjugated with the enzyme peroxidase detects the generated immune complex. A colorless substrate is converted into the colored product. The signal intensity of the reaction product is proportional to the antibody activity in the sample. After stopping the signal intensity of the reaction product is measured photometrically.

**4 TEST COMPONENTS**

Component	Description
<b>Microtiter plate</b> <b>A</b> Ag   96 1 piece	12 breakable microtiter strips (ready-to-use), 8 wells per strip, each well coated with mannan from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Calibrator</b> <b>0 – 4</b> CAL 5 x 1 mL, white cap	Colored dilutions of human serum (ready-to-use; contains ProClin 950) <i>The antibody activities are indicated on the quality control certificate.</i>
<b>Negative control</b> <b>N</b> CONTROL   - 1 x 1 mL, green cap	Colored dilution of human serum (ready-to-use; contains ProClin 950) <i>The antibody activity is indicated on the quality control certificate.</i>
<b>Positive control</b> <b>P</b> CONTROL   + 1 x 1 mL, red cap	Colored dilution of human serum (ready-to-use; contains ProClin 950) <i>The antibody activity is indicated on the quality control certificate.</i>
<b>Sample diluent</b> <b>C</b> DIL 1 x 100 mL, black cap	Colored solution (ready-to-use; contains ProClin 950)
<b>Wash buffer</b> <b>B</b> WASH   10x 1 x 100 mL, white cap	Concentrated solution (10x; contains ProClin 950)
<b>Conjugate IgA</b> <b>D</b> CONJ 1 x 15 mL, violet cap	Colored solution of polyclonal anti-human IgA antibody conjugated to horseradish peroxidase (ready-to-use; contains ProClin 950)
<b>Substrate</b> <b>E</b> SOLN   TMB 1 x 15 mL, blue cap	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (ready-to-use)
<b>Stop solution</b> <b>F</b> H2SO4   0.25M 1 x 15 mL, yellow cap	0.25 M Sulfuric acid (ready-to-use)
<b>Adhesive Foil</b> 2 pieces	-
<b>QC Certificate</b> 1 piece	-
<b>Instructions for Use</b> 1 piece	-

**5 MATERIALS REQUIRED IN ADDITION**

- Common laboratory equipment
- Precision pipettes (5 – 1000 µL), multi-channel pipettes (100 – 1000 µL) and disposable pipette tips
- Graduated cylinders (100 – 1000 mL)
- Sample tubes for the preparation of dilutions
- Vortex mixer or other rotators
- Microtiter plate washer or wash comb
- Microtiter plate reader with optical filters for 450 nm and 620 nm or 690 nm
- Adsorbent paper or paper towel
- Distilled or de-ionized water

**6 STORAGE AND STABILITY**

Upon receipt, all test components must be stored at 2 °C to 8 °C, preferably in the original kit box. If stored properly in their original containers, all components are stable until their expiry date. All components are stable for at least 2 months after opening when stored properly at 2 °C to 8 °C.

## 7 GENERAL INFORMATION

This product is for in vitro diagnostic use only. The instructions for use must be carefully read before use. They are valid only for the present product with the given composition and must be strictly followed to ensure reliable test results. Deviations can lead to erroneous test results. Components must not be exchanged by test reagents of different lots or of other manufacturers.

Contamination of reagents must be avoided by use of aseptic techniques when removing aliquots from the vials. After use, reagent vials must be tightly closed with their corresponding caps.

Cross-contamination of samples or reagents can lead to inconsistent test results and must be avoided by use of consistent pipetting techniques.

Exposure of reagents to strong light must be avoided throughout the entire test procedure and storage.

Insufficient washing will result in poor precision and elevated measurement signals. After each washing step any residual fluid has to be removed completely.

## 8 PREPARATION

### 8.1 Preparation of Reagents

All components including the microtiter plate must be brought to room temperature (RT: 18 °C to 25 °C) before use for at least 30 min. All liquid components must be mixed gently to ensure homogeneity.

#### 8.1.1 Microtiter Plate

The microtiter plate is sealed in an aluminium bag. Unused test strips should always be stored refrigerated and protected from moisture with the desiccant in the properly sealed aluminum bag. Carefully resealed, the test strips can be used for 8 weeks after opening.

#### 8.1.2 Calibrators

The calibrators are ready-to-use and must not be diluted any further. Calibrators must be used in each test run.

#### 8.1.3 Controls

The positive and the negative controls are ready-to-use and must not be diluted any further. Controls must be used in each test run. Laboratories can also validate their own control samples and use them alternatively.

#### 8.1.4 Sample Diluent

The sample diluent is ready-to-use.

#### 8.1.5 Wash Buffer

The wash buffer is concentrated and must be diluted **1:10** with distilled water before use (e. g. 100 mL + 900 mL). A sufficient amount of washing solution must be prepared. The diluted washing solution can be stored at 2 °C to 8 °C up to 30 days.

#### 8.1.6 Conjugate

The conjugate is ready-to-use and stable up to 8 weeks after opening when stored at 2 °C to 8 °C.

#### 8.1.7 Substrate

The substrate is ready-to-use. Exposure of the substrate solution to strong light should be avoided.

#### 8.1.8 Stop Solution

The stop solution is ready-to-use.

### 8.2 Preparation of Samples

#### 8.2.1 Sample Material

The use of freshly collected **serum** from blood taken by venipuncture is recommended.

The use of icteric, lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples should be avoided. Insoluble substances must be removed from the sample by centrifugation. Samples must not be thermally inactivated.

#### 8.2.2 Sample Dilution

The samples must be **diluted 1:101** (e. g. 10 µL + 1000 µL) with sample diluent and mixed thoroughly. Building of foam should be avoided.

#### 8.2.3 Sample Storage

Samples may be kept at 2 °C to 8 °C up to three days.

Long-term storage requires -20 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided. For multiple use, samples should be aliquoted and kept at -20 °C.

## 9 TEST PERFORMANCE

### 9.1 Pipetting Scheme

The following pipetting scheme is recommended:

	1	2	3	4
A	CAL 0	Sample 2		
B	CAL 1	Sample 3		
C	CAL 2	Sample 4		
D	CAL 3	Sample 5		
E	CAL 4	...		
F	N	...		
G	P	...		
H	Sample 1	...		

### 9.2 Procedure

The indicated incubation times and temperatures must be adhered to, and significant time shifts during pipetting samples and reagents must be avoided. The microtiter plate should be shortly shaken after addition of reagents.

Step	Description
1. Addition of calibrators, controls and diluted samples	Add 100 µL ready-to-use calibrators, controls and diluted samples per well
2. Incubation	Cover the plate and incubate for 60 min. at RT
3. Wash cycle	Aspirate the solution and wash 3 times with 300 µL washing solution with at least 5 seconds soaking time each; dry by tapping the microtiter plate on a paper towel to remove any residual droplets
4. Addition of conjugate	Add 100 µL ready-to-use conjugate to each well
5. Incubation	Cover the plate and incubate for 30 min. at RT
6. Wash cycle	Aspirate the solution and wash 3 times with 300 µL washing solution with at least 5 seconds soaking time each; dry by tapping the microtiter plate on a paper towel to remove any residual droplets
7. Addition of substrate	Add 100 µL ready-to-use substrate to each well
8. Incubation	Cover the plate and incubate for 15 min. in the dark at RT
9. Addition of Stop Solution	Add 100 µL ready-to-use stop solution to each well
10. Analysis	Read optical density (OD) at 450 nm versus 620 or 690 nm within 30 min. after stopping the reaction

### 9.3 Automation

Automated processing of the immunoassays must be performed analogous to manual use and validated by the user.

## 10 TEST EVALUATION

### 10.1 Metrological Traceability

The immunoassay is calibrated using an internal reference sample. Quantitative results are expressed in U/mL.

### 10.2 Standard Curve

For generation of a standard curve, the optical signals (optical density, OD) of the calibrators are plotted against their antibody activities and correlated by a 4-parameter logistic (4 PL) fit. Antibody activities of unknown samples can be derived directly from their optical signals by use of the generated standard curve.

### 10.3 Criteria of Validity

Test runs are only valid if the following criteria of validity are fulfilled:

- OD CAL 0 < CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4
- OD CAL 4 > 1.2
- The negative control must be evaluated negative.
- The positive control must be evaluated positive and present an antibody activity within the validity range indicated on the quality control certificate.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

### 10.4 Troubleshooting

In case of an invalid test run, the expiry dates and storage conditions, incubation times and temperatures, and precise calibration of all instruments used should be verified. If no reason for an invalid test run could be identified, please contact the supplier or manufacturer of the product.

### 10.5 Reference Ranges

The reference ranges are indicated below:

	Interpretation
Antibody activity < 20 U/mL	negative
Antibody activity ≥ 20 U/mL	positive

As a result of different seroprevalences in individual regions, each laboratory should verify the reference ranges by own analysis and adapt, if necessary.

### 10.6 Interpretation of Test Results

A positive test result indicates the presence of specific antibodies.

A negative result indicates the absence of specific antibodies, but does not exclude the possibility of an autoimmune reaction.

In case of a borderline test result, a reliable evaluation is not possible.

### 10.7 Limitations of the Method

The interpretation of test results must always be considered in combination with the clinical picture of the patient. The diagnosis should not be based on the results of a sole diagnostic method. All clinical and laboratory findings should be evaluated to state a diagnosis. For confirmation, further investigations should be carried out.

## 11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1 Analytical Performance Characteristics

#### 11.1.1 Precision

The precision of test results was assessed by the determination of the intra- and inter-assay variation by the analysis of multiple samples with different antibody activities.

	Intra-assay Precision		Inter-assay Precision	
	U/mL	CV (%)	U/mL	CV (%)
Sample 1	199	6.6	215	8.2
Sample 2	65	4.4	65	6.8
Sample 3	18	6.7	19	8.6



### 11.1.2 Measurement Range

Reliable accuracy, trueness, precision, linearity and recovery of test results have been observed within the measurement range of the assay from the LoQ to the upper calibrator in comprehensive studies.

Samples with test results above the upper calibrator should be reported as > max.

Samples with test results below the LoQ should be reported as < min.

If test results above the upper calibrator are observed, the samples may be tested at a higher dilution. The resulting antibody activity must be multiplied with the additional dilution factor.

## 11.2 Diagnostic Performance Characteristics

### 11.2.1 Diagnostic Sensitivity and Specificity

Sensitivity and specificity were assessed by the analysis of 116 serum samples from patients with Crohn`s disease and 75 serum samples from patients with ulcerative colitis:

	Diagnostic Performance
Sensitivity	42.0 %
Specificity	92.0 %

## 12 WARNINGS AND PRECAUTIONS

The product is designed exclusively for *in vitro* diagnostic use by qualified, authorized and trained personnel. All test components and human samples should be handled with care as potentially hazardous. Good laboratory practices (GLP) and all relevant regulations should be adhered to.

In case the product is damaged or product information including labelling is wrong or incorrect, please contact the manufacturer or supplier.

This product contains preparations of human and / or animal origin. Any material derived from human body fluids or organs used for the preparation of components were tested and found negative for HBsAg (Hepatitis B-Virus-surface Antigen) and anti-HIV as well as anti-HCV antibodies. However, all components and all patient samples should be handled as potentially hazardous in accordance with national laws and appropriate guidelines on biological safety.

As the product contains potentially hazardous materials, the following precautions should be followed: Do not smoke, eat or drink while handling kit material or samples. Avoid direct contact to kit material or samples by wearing protective gloves, laboratory coat and safety glasses. Never pipette material by mouth. Wipe up spills promptly and wash the affected surface thoroughly with a decontaminant. Wash hands thoroughly after use.

Some of the reagents contain ProClin (< 1.0 %) as a preservative, may cause skin sensitization (H317) and must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucosa (P280, P333+P313).

The information in the safety data sheet on possible hazards, first aid measures, measures in the event of the unintentional release of large quantities, handling and storage, personal protective equipment, information on disposal as well as information on toxicology must be observed.

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the member state in which the user and/or the patient is established.

## 13 DISPOSAL

For decontamination and disposal the recommendations of the CDC as well as the relevant local and national environmental guidelines and regulations should be adhered to.

Samples, potentially contaminated materials and infectious waste must be decontaminated, e.g. by autoclaving for 20 minutes at 121 °C.

## 14 REFERENCES

1. Conrad K, Schmechta H, Klafki A, Lobeck G, Uhlig HH, Gerdi S, Henker J: Serological differentiation of inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastrol & Hepatol.* 2002, 14, 129 – 35.
2. Vermeire S: Serological Diagnosis in IBD. *IBDM* 2002, 3, 82 – 9.
3. Degenhardt F, Dirmeier A, Lopez R, Lang S, Kunst C, Roggenbuck D, Reinhold D, Szymczak S, Rogler G, Klebl F, Franke A, Rieder F. Serologic Anti-GP2 Antibodies Are Associated with Genetic Polymorphisms, Fibrostenosis, and Need for Surgical Resection in Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2016, 22, 2648 – 57.

## 1 ZWECKBESTIMMUNG

Der ASCA IgA ELISA ist ein quantitativer Immunoassay zur Bestimmung von IgA Antikörpern gegen *Saccharomyces cerevisiae* in humanem Serum.

Der ASCA IgA ELISA dient zur Unterstützung bei der Diagnose von Morbus Crohn in Verbindung mit anderen klinischen und laboratoriumsmedizinischen Untersuchungen.

Der Immunoassay ist für den manuellen professionellen *in-vitro* diagnostischen Gebrauch bestimmt.

## 2 DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn (Enteritis regionalis) oder Colitis ulcerosa sind durch eine unklare Ätiologie und chronisch-rezidivierende Entzündungsprozesse des Verdauungssystems gekennzeichnet. Während bei der Colitis ulcerosa die Entzündung vor allem in der Mucosa und Submucosa des Colon und Rectum auftritt, sind beim Morbus Crohn wanddurchgreifende, granulomatöse Entzündungsprozesse des gesamten Gastrointestinaltraktes charakteristisch.

Immunologische, infektiöse, genetische und Umweltfaktoren scheinen das Risiko für die Ausbildung dieser Erkrankungen zu erhöhen.

Die Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen von anderen Erkrankungen wie chronischer Diarrhoe, recurrentem abdominalen Schmerz, akuter infektiöser Colitis oder Anorexie sowie die Differentialdiagnose von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist eine klinische Herausforderung.

Für die serologische Diagnostik von Morbus Crohn sind Antikörper der Isotypen IgG und IgA gegen Mannan der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben worden. Bis zu 70 % der Patienten mit Morbus Crohn weisen zirkulierende Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) auf. Die Ursache des Auftretens von ASCA sind bisher unklar, sie scheinen jedoch mit einer entzündlichen Beteiligung des Dünndarms assoziiert zu sein.

Zusammen mit atypischen antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (aANCA), die für einen hohen Anteil von Patienten mit Colitis ulcerosa charakteristisch sind und mittels Immunfluoreszenz bestimmt werden, können ASCA zur Differentialdiagnose von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa verwendet werden.

## 3 TESTPRINZIP

Der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ist ein immunologisches Verfahren zur Bestimmung spezifischer Antikörper. Die Streifen der Mikrotiterplatte sind mit testspezifischen Antigenen beschichtet. Sind Antikörper in der Patientenprobe vorhanden, binden sie an die Antigene. Ein mit Peroxidase markierter Sekundärantikörper detektiert den so gebildeten Immunkomplex. Ein farbloses Substrat wird in ein farbiges Produkt umgewandelt. Die Signalintensität des Reaktionsprodukts ist proportional zur Antikörperaktivität in der Probe. Nach Abstoppen wird die Signalintensität des Reaktionsprodukts photometrisch erfasst.

**4 TESTKOMPONENTEN**

Komponente	Beschreibung
<b>Mikrotiterplatte</b> <b>A</b> Ag   96 1 Stück	12 brechbare Mikrotiterstreifen (gebrauchsfertig), 8 Kavitäten pro Streifen, jede Kavität ist mit Mannan von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> beschichtet
<b>Kalibrator</b> <b>0 – 4</b> CAL 5 x 1 mL, weißer Deckel	Gefärbte Lösung mit humanem Serum (gebrauchsfertig; enthält ProClin 950) <i>Die Antikörperaktivitäten sind auf dem Qualitätskontroll-zertifikat angegeben.</i>
<b>Negativkontrolle</b> <b>N</b> CONTROL   - 1 x 1 mL, grüner Deckel	Gefärbte Lösung mit humanem Serum (gebrauchsfertig; enthält ProClin 950) <i>Die Antikörperaktivität ist auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben.</i>
<b>Positivkontrolle</b> <b>P</b> CONTROL   + 1 x 1 mL, roter Deckel	Gefärbte Lösung mit humanem Serum (gebrauchsfertig; enthält ProClin 950) <i>Die Antikörperaktivität ist auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben.</i>
<b>Probenverdünner</b> <b>C</b> DIL 1 x 100 mL, schwarzer Deckel	Gefärbte Lösung (gebrauchsfertig; enthält ProClin 950)
<b>Waschpuffer</b> <b>B</b> BUF   WASH   10x 1 x 100 mL, weißer Deckel	Konzentrierte Lösung (10x; enthält ProClin 950)
<b>Konjugat IgA</b> <b>D</b> CONJ 1 x 15 mL, violetter Deckel	Gefärbte Lösung mit polyklonalem anti-human IgA-Antikörper, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (gebrauchsfertig; enthält ProClin 950)
<b>Substrat</b> <b>E</b> SOLN   TMB 1 x 15 mL, blauer Deckel	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (gebrauchsfertig)
<b>Stopplösung</b> <b>F</b> H2SO4   0.25M 1 x 15 mL, gelber Deckel	0.25 M Schwefelsäure (gebrauchsfertig)
<b>Adhäsionsfolie</b> 2 Stück	
<b>Qualitätskontrollzertifikat</b> 1 Stück	-
<b>Gebrauchsanweisung</b> 1 Stück	-

**5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL**

- Übliche Laborausrüstung
- Präzisionspipetten (5 – 1000 µL), Multikanalpipetten (100 – 1000 µL) und Einwegpipettenspitzen
- Messzylinder (100 – 1000 mL)
- Probenröhrchen zur Herstellung von Verdünnungen
- Vortex Mixer oder anderer Rotator
- Mikrotiterplatten Washer oder Waschkamm
- Mikrotiterplatten Reader mit optischen Filtern für 450 nm und 620 nm oder 690 nm
- Adsorbierendes Papier oder Papiertücher
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

**6 LAGERUNG UND HALTBARKEIT**

Nach Erhalt müssen alle Testkomponenten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden, vorzugsweise in der Originalverpackung des Kits. Bei sachgemäßer Lagerung in den Originalbehältern sind alle Komponenten bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Nach Anbruch und sachgemäßer Lagerung bei 2 °C bis 8 °C sind alle Komponenten mindestens 2 Monate haltbar.

## 7 ALLGEMEINE HINWEISE

Dieses Produkt ist nur für die *In-vitro*-Diagnostik bestimmt. Die Gebrauchsanweisung ist vor Anwendung sorgfältig zu lesen. Sie gilt nur für das vorliegende Produkt mit der angegebenen Zusammensetzung. Die Gebrauchsanweisung muss strikt befolgt werden, um zuverlässige Testergebnisse zu gewährleisten. Abweichungen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Komponenten dürfen nicht durch Testreagenzien anderer Chargen oder anderer Hersteller ausgetauscht werden.

Kontaminationen der Reagenzien müssen durch Anwendung aseptischer Techniken bei der Entnahme von Aliquots aus den Fläschchen vermieden werden. Nach Gebrauch müssen die Reagenzienfläschchen wieder fest mit den zugehörigen Deckeln verschlossen werden.

Kreuzkontaminationen von Proben oder Reagenzien können zu widersprüchlichen Testergebnissen führen und müssen durch Anwendung konsistenter Pipettier Techniken vermieden werden.

Die Reagenzien dürfen während des gesamten Verfahrens sowie bei Lagerung keiner intensiven Lichtquelle ausgesetzt werden.

Unzureichendes Waschen führt zu schlechter Präzision und erhöhten Messwerten. Nach jedem Waschschrift ist die Restflüssigkeit vollständig zu entfernen.

## 8 VORBEREITUNG

### 8.1 Vorbereitung von Reagenzien

Alle Komponenten und die Mikrotiterplatte müssen vor Gebrauch für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur (RT: 18 °C bis 25 °C) gebracht werden. Flüssige Reagenzien müssen zur Homogenisierung gut durchmischt werden.

#### 8.1.1 Mikrotiterplatte

Die Mikrotiterplatte ist in einem Aluminiumbeutel eingeschweißt. Unbenutzte Teststreifen sollten immer gekühlt und mit Trockenmittel vor Feuchtigkeit geschützt im gut verschlossenen Aluminiumbeutel gelagert werden.

Sorgfältig verschlossen sind die Teststreifen 8 Wochen nach Anbruch verwendbar.

#### 8.1.2 Kalibratoren

Die Kalibratoren sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.

Kalibratoren müssen in jedem Testansatz mitgeführt werden.

#### 8.1.3 Kontrollen

Positive und negative Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden. Kontrollen müssen in jedem Testansatz mitgeführt werden. Alternativ können Laboratorien auch eigene Kontrollen validieren und verwenden.

#### 8.1.4 Probenverdünner

Der Probenverdünner ist gebrauchsfertig.

#### 8.1.5 Waschpuffer

Der konzentrierte Waschpuffer muss vor Anwendung **1:10** mit destilliertem Wasser verdünnt werden (z. B. 100 mL + 900 mL). Eine ausreichende Menge Waschlösung ist bereit zu stellen.

Die gebrauchsfertige Waschlösung kann bei 2 °C bis 8 °C bis zu 30 Tage gelagert werden.

#### 8.1.6 Konjugat

Das Konjugat ist gebrauchsfertig und nach Anbruch und Lagerung bei 2 °C bis 8 °C 8 Wochen stabil.

#### 8.1.7 Substrat

Das Substrat ist gebrauchsfertig. Eine starke Lichteinwirkung auf die Substratlösung sollte vermieden werden.

#### 8.1.8 Stopplösung

Die Stopplösung ist gebrauchsfertig.

### 8.2 Vorbereitung der Proben

#### 8.2.1 Probenmaterial

Die Verwendung frischer **Serumproben** aus venös entnommenem Blut wird empfohlen.

Ikterische, lipämische, hämolytische oder bakteriell kontaminierte Proben sollten nicht verwendet werden. Unlösliche Bestandteile sollten durch Zentrifugation aus der Probe entfernt werden. Die Proben dürfen nicht thermisch inaktiviert werden.

#### 8.2.2 Probenverdünnung

Die Proben müssen **1:101** (z. B. 10 µL + 1000 µL) in Probenverdünner **verdünnt** und gut durchmischt werden. Schaumbildung sollte vermieden werden.

### 8.2.3 Probenlagerung

Proben können bis zu drei Tagen bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden.

Eine längere Lagerung der Proben erfordert -20 °C. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Zur Mehrfachverwendung sollten die Proben aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt werden.

## 9 DURCHFÜHRUNG

### 9.1 Pipettierschema

Das folgende Pipettierschema wird empfohlen:

	1	2	3	4
<b>A</b>	CAL 0	Probe 2		
<b>B</b>	CAL 1	Probe 3		
<b>C</b>	CAL 2	Probe 4		
<b>D</b>	CAL 3	Probe 5		
<b>E</b>	CAL 4	...		
<b>F</b>	N	...		
<b>G</b>	P	...		
<b>H</b>	Probe 1	...		

### 9.2 Ablaufschema

Die angegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen müssen eingehalten und starke Zeitverschiebungen beim Pipettieren von Proben und Reagenzien vermieden werden. Nach Zugabe der Reagenzien sollte die Mikrotiterplatte kurz geschüttelt werden.

Schritt	Beschreibung
1. Zugabe von Kalibratoren, Kontrollen und verdünnten Proben	Zugabe von 100 µL gebrauchsfertigen Kalibratoren, Kontrollen und verdünnten Proben pro Kavität
2. Inkubation	Abdecken der Platte und Inkubation für 60 min bei RT
3. Waschzyklus	Absaugen der Flüssigkeit aus den Kavitäten und 3x Waschen mit jeweils 300 µL Waschlösung pro Kavität mit mindestens 5 Sekunden Einwirkzeit; Platte auf Filterpapier ausklopfen, um Restfeuchtigkeit zu entfernen.
4. Zugabe des Konjugats	Zugabe von je 100 µL gebrauchsfertigem Konjugat pro Kavität
5. Inkubation	Abdecken der Platte und Inkubation für 30 min bei RT
6. Waschzyklus	Absaugen der Flüssigkeit aus den Kavitäten und 3x Waschen mit jeweils 300 µL Waschlösung pro Kavität mit mindestens 5 Sek. Einwirkzeit; Platte auf Filterpapier ausklopfen, um Restfeuchtigkeit zu entfernen.
7. Zugabe des Substrats	Zugabe von je 100 µL gebrauchsfertigem Substrats pro Kavität
8. Inkubation	Abdecken der Platte und Inkubation für 15 min im Dunkeln bei RT
9. Zugabe der Stopplösung	Zugabe von je 100 µL gebrauchsfertiger Stopplösung pro Kavität
10. Analyse	Messung der optischen Dichte (OD) innerhalb von 30 min bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm oder 690 nm

### 9.3 Automation

Die automatische Prozessierung des Immunoassays erfolgt analog zur manuellen Anwendung und muss durch den Anwender validiert werden.

## 10 AUSWERTUNG

### 10.1 Metrologische Rückverfolgbarkeit

Der Immunoassay wurde an einer internen Referenzprobe kalibriert. Quantitative Ergebnisse werden in U/mL angegeben.

### 10.2 Standardkurve

Zur Erstellung einer Standardkurve werden die optischen Signale (optische Dichte, OD) der Kalibratoren gegen ihre Antikörperaktivitäten aufgetragen und mit Hilfe eines 4-Parameter-Logistik-Fits (4 PL) korreliert. Unter Verwendung der so generierten Standardkurve können Antikörperaktivitäten unbekannter Proben direkt aus ihren optischen Signalen abgeleitet werden.

### 10.3 Validitätskriterien

Ein Testlauf ist valide, wenn die nachfolgenden Validitätskriterien erfüllt sind:

- OD CAL 0 < CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4
- OD CAL 4 > 1.2
- Die Negativkontrolle muss negativ bewertet sein.
- Die Positivkontrolle muss positiv bewertet sein und im Gültigkeitsbereich liegen, der auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben ist.

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf nicht valide und muss wiederholt werden.

### 10.4 Problembehandlung

Im Falle eines invaliden Testlaufs sollten die Haltbarkeiten und Lagerungsbedingungen, die Inkubationszeiten und -temperaturen sowie die präzise Kalibrierung der Pipetten und aller anderen Geräte überprüft werden. Sollte sich kein Grund für den invaliden Testlauf finden, kontaktieren Sie bitte den Anbieter oder Hersteller des Produkts.

### 10.5 Referenzbereiche

Die Referenzbereiche sind nachfolgend angegeben:

	Interpretation
Antikörperaktivität < 20 U/mL	negativ
Antikörperaktivität ≥ 20 U/mL	positiv

Aufgrund der unterschiedlichen Seroprävalenzen in einzelnen Regionen sollte jedes Labor den Grenzwertbereich durch eigene Analysen verifizieren und ggf. anpassen.

### 10.6 Interpretation der Ergebnisse

Ein positives Ergebnis bestätigt die Anwesenheit spezifischer Antikörper.

Ein negatives Ergebnis bestätigt die Abwesenheit spezifischer Antikörper, schließt jedoch eine Autoimmunreaktion nicht aus.

Im Fall eines grenzwertigen Ergebnisses ist keine sichere Bewertung der Patientenprobe möglich.

### 10.7 Einschränkungen der Methode

Die Interpretation der Testergebnisse muss stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild des Patienten erfolgen. Eine Diagnose sollte nicht allein auf den Ergebnissen einer individuellen diagnostischen Methode erfolgen, sondern immer unter Berücksichtigung aller klinischen und laboratoriumsmedizinischen Befunde erstellt werden. Zur Bestätigung sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

## 11 LEISTUNGSMERKMALE

### 11.1 Analytische Leistungsmerkmale

#### 11.1.1 Präzision

Die Präzision der Messergebnisse wurde durch die Bestimmung der Intra- und Inter-Assay-Varianz durch Analyse mehrerer Proben mit unterschiedlichen Antikörperaktivitäten ermittelt.

	Intraassay-Präzision		Interassay-Präzision	
	U/mL	VK (%)	U/mL	VK (%)
Probe 1	199	6,6	215	8,2
Probe 2	65	4,4	65	6,8
Probe 3	18	6,7	19	8,6

### 11.1.2 Messbereich

Im Rahmen umfangreicher Leistungsbewertungsstudie wurden die Genauigkeit, Richtigkeit, Präzision, Linearität und Wiederfindung im Messbereich zwischen dem LoQ und dem höchsten Kalibrator nachgewiesen.

Proben mit Ergebnissen oberhalb des höchsten Kalibrators sollten mit >max angegeben werden.

Proben, mit Ergebnissen unterhalb des LoQ, sollten mit <min angegeben werden.

Patientenproben mit Messwerten oberhalb des höchsten Kalibrators können in einer höheren Verdünnung analysiert werden. Zur Quantifizierung sind die erhaltenen Antikörperaktivitäten dann mit dem zusätzlichen Verdünnungs-faktor zu multiplizieren.

## 11.2 Diagnostische Leistungsmerkmale

### 11.2.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität und Spezifität des Immunoassays wurden durch die Analyse von 116 Serumproben von Patienten mit Morbus Crohn und 75 Serumproben von Patienten mit Colitis ulcerosa bestimmt.

	Diagnostische Leistung
Sensitivität	42 %
Spezifität	92 %

## 12 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Das Produkt ist ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik und nur für die Anwendung durch qualifiziertes, autorisiertes und geschultes Fachpersonal vorgesehen. Alle Testkomponenten und menschliche Proben sollten als potenziell gefährlich mit entsprechender Vorsicht behandelt werden. Gute Laborpraxis (GLP) und alle relevanten Vorschriften sollten eingehalten werden.

Sollte das Produkt beschädigt oder die Produktinformationen einschließlich der Etikettierung falsch oder fehlerhaft sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller oder den Lieferanten.

Das Produkt enthält Präparationen menschlichen und / oder tierischen Ursprungs. Obwohl alle Materialien aus humanen Körperflüssigkeiten oder Organen zur Herstellung von Komponenten negativ auf HBsAg (Hepatitis B-Virus-surface Antigen), anti-HIV- und anti-HCV-Antikörper getestet wurden, müssen alle Komponenten und Patientenproben gemäß nationalen Gesetzen und anzuwendenden Richtlinien zur Biologischen Sicherheit als potenziell gefährlich eingestuft und entsprechend behandelt werden.

Da das Produkt potenziell gefährliche Materialien enthält, sollten die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden: Beim Umgang mit Kitmaterial oder Proben nicht rauchen, essen oder trinken. Direkten Kontakt mit Kitmaterial oder Proben durch das Tragen von Schutzhandschuhen, Laborkittel und Schutzbrille vermeiden. Niemals Material mit dem Mund pipettieren. Verschüttetes Material sofort aufnehmen und die betroffene Oberfläche gründlich mit einem Dekontaminationsmittel reinigen. Nach Gebrauch gründlich Hände waschen.

Einige Reagenzien enthalten ProClin (< 1,0 %) als Konservierungsmittel, können eine Sensibilisierung der Haut bewirken (H317) und dürfen nicht verschluckt werden oder mit Haut oder Schleimhaut in Berührung kommen (P280, P333+P313).

Die Angaben im Sicherheitsdatenblatt zu möglichen Gefahren, Erste-Hilfe-Maßnahmen, Maßnahmen bei unbeabsichtigter Freisetzung großer Mengen, Handhabung und Lagerung, persönliche Schutzausrüstung, Hinweise zur Entsorgung sowie Angaben zur Toxikologie sind zu beachten.

Jeder schwerwiegende Vorfall im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats zu melden, in dem der Benutzer und / oder der Patient ansässig sind.

## 13 ENTSORGUNG

Zur Dekontamination und Entsorgung müssen die Empfehlungen der CDC sowie die jeweils geltenden lokalen und nationalen Richtlinien und gesetzlichen Vorschriften eingehalten werden.

Proben, potentiell kontaminierte Materialien und infektiöse Abfälle müssen, z. B. durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C, dekontaminiert werden.

## 14 REFERENZEN

- Conrad K, Schmechta H, Klafki A, Lobeck G, Uhlig HH, Gerdi S, Henker J: Serological differentiation of inflammatory bowel diseases. Eur J Gastro & Hepatol. 2002, 14, 129 – 35.
- Vermeire S: Serological Diagnosis in IBD. IBDM 2002, 3, 82 – 9.
- Degenhardt F, Dirmeier A, Lopez R, Lang S, Kunst C, Roggenbuck D, Reinhold D, Szymczak S, Rogler G, Klebl F, Franke A, Rieder F. Serologic Anti-GP2 Antibodies Are Associated with Genetic Polymorphisms, Fibrostenosis, and Need for Surgical Resection in Crohn's Disease. Inflamm. Bowel Dis. 2016, 22, 2648 – 57.

## 1 DESTINAZIONE D'USO

L'ASCA IgA ELISA è un immunodosaggio quantitativo per la determinazione degli anticorpi IgA contro *Saccharomyces cerevisiae* nel siero umano.

L'ASCA IgA ELISA è inteso come ausilio nella diagnosi della malattia di Crohn, insieme ad altri risultati clinici e di laboratorio.

L'immunodosaggio è progettato per l'uso professionale manuale nella diagnostica *in vitro*.

## 2 RILEVANZA DIAGNOSTICA

Le malattie infiammatorie intestinali non specifiche, tra cui la malattia di Crohn (MC), anche nota come enterite regionale, e la colite ulcerosa (CU), sono caratterizzate da un'eziologia sconosciuta e da processi infiammatori cronici-remittenti dell'intestino. Mentre l'infiammazione della CU è ristretta alla mucosa e alla sottomucosa del colon e del retto, la MC presenta un'infiammazione diffusa del tratto gastrointestinale con formazione di granulomi. Il rischio di sviluppare una di queste malattie è fortemente influenzato da fattori immunologici, genetici, infettivi e ambientali.

La diagnosi differenziale tra le malattie infiammatorie intestinali e la diarrea cronica, i dolori addominali ricorrenti, la colite infettiva, l'anoressia e la differenziazione della MC dalla CU è ancora una sfida importante.

La determinazione degli anticorpi IgA e IgG contro *Saccharomyces cerevisiae* (lievito di birra) è stata descritta come un importante marcatore sierologico per la diagnosi differenziale della malattia di Crohn. Fino al 70% dei pazienti con MC presenta livelli di anticorpi contro *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). Sebbene la causa della loro comparsa non sia chiara, gli ASCA sono fortemente associati ai processi infiammatori dell'intestino.

Gli ASCA sono un parametro valido per la differenziazione della MC e della CU in combinazione con la rilevazione di autoanticorpi contro gli antigeni citoplasmatici atipici dei neutrofili (aANCA), che si riscontrano principalmente nei pazienti con CU.

## 3 PRINCIPIO DEL SAGGIO

L'ELISA (saggio immuno-assorbente legato ad un enzima) è un saggio immunologico per la determinazione di anticorpi specifici. Le strisce della piastra per microtitolazione sono rivestite con antigeni specifici per il saggio. Se nel campione del paziente sono presenti anticorpi, questi si legano agli antigeni. Un anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi rileva il complesso immunitario generato. Un substrato incolore viene convertito in un prodotto colorato. L'intensità del segnale del prodotto di reazione è proporzionale all'attività degli anticorpi nel campione. Dopo l'arresto della reazione, l'intensità del segnale del prodotto di reazione viene misurata fotometricamente.



**4 COMPONENTI DEL SAGGIO**

Componente	Descrizione
<b>Piastra per microtitolazione</b> <b>A</b> <b>Ag   96</b> 1 pezzo	12 strisce per microtitolazione separabili (pronte all'uso), 8 pozzetti per striscia, ogni pozzetto rivestito con mannano da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Calibratore</b> <b>0 - 4</b> <b>CAL</b> 5 x 1 mL, tappo bianco	Diluizioni colorate di siero umano (pronte all'uso; contengono ProClin 950) <i>Le attività anticorpali sono indicate nel certificato di controllo qualità.</i>
<b>Controllo negativo</b> <b>N</b> <b>CONTROL   -</b> 1 x 1 mL, tappo verde	Diluizione colorata di siero umano (pronta all'uso; contiene ProClin 950) <i>L'attività dell'anticorpo è indicata sul certificato di controllo qualità.</i>
<b>Controllo positivo</b> <b>P</b> <b>CONTROL   +</b> 1 x 1 mL, tappo rosso	Diluizione colorata di siero umano (pronta all'uso; contiene ProClin 950) <i>L'attività dell'anticorpo è indicata sul certificato di controllo qualità.</i>
<b>Diluyente del campione</b> <b>C</b> <b>DIL</b> 1 x 100 mL, tappo nero	Soluzione colorata (pronta all'uso; contiene ProClin 950)
<b>Tampone di lavaggio</b> <b>B</b> <b>BUF WASH 10x</b> 1 x 100 mL, tappo bianco	Soluzione concentrata (10x; contiene ProClin 950)
<b>Coniugato IgA</b> <b>D</b> <b>CONJ</b> 1 x 15 mL, tappo viola	Soluzione colorata di anticorpo policlonale anti-IgA umano coniugato con perossidasi di rafano (pronta all'uso; contiene ProClin 950)
<b>Substrato</b> <b>E</b> <b>SOLN   TMB</b> 1 x 15 mL, tappo blu	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (pronto all'uso)
<b>Soluzione d'arresto</b> <b>F</b> <b>H2SO4   0.25M</b> 1 x 15 mL, tappo giallo	0,25 M Acido solforico (pronto all'uso)
<b>Foglio adesivo</b> 2 pezzi	-
<b>Certificato CQ</b> 1 pezzo	-
<b>Istruzioni per l'uso</b> 1 pezzo	-

**5 MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO**

- Comuni attrezzature di laboratorio
- Pipette di precisione (5-1000 µL), pipette multicanale (100-1000 µL) e puntali monouso.
- Cilindri graduati (100 - 1000 mL)
- Provette per la preparazione delle diluizioni
- Miscelatore a vortice o altri rotatori
- Lavatore di piastre per microtitolazione o pettine di lavaggio
- Lettore di piastre per microtitolazione con filtri ottici per 450 nm e 620 nm o 690 nm
- Carta assorbente
- Acqua distillata o deionizzata

**6 CONSERVAZIONE E STABILITÀ**

Una volta ricevuti, tutti i componenti del saggio devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C, preferibilmente nella confezione originale del kit. Se conservati correttamente nei loro contenitori originali, tutti i componenti sono stabili fino alla data di scadenza.

Tutti i componenti sono stabili per almeno 2 mesi dopo l'apertura se conservati correttamente a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

## 7 INFORMAZIONI GENERALI

Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro*. Le istruzioni per l'uso devono essere lette attentamente prima dell'uso. Esse sono valide solo per il presente prodotto con la composizione indicata e devono essere seguite rigorosamente per garantirne risultati affidabili. Eventuali deviazioni possono portare a risultati errati. I componenti non devono essere scambiati con reagenti di lotti diversi o di altri produttori.

La contaminazione dei reagenti deve essere evitata utilizzando tecniche asettiche durante il prelievo dai contenitori. Dopo l'uso, le fiale di reagente devono essere chiuse ermeticamente con i rispettivi tappi.

La contaminazione incrociata di campioni o reagenti può portare a risultati incoerenti e deve essere evitata utilizzando tecniche di pipettaggio coerenti.

L'esposizione dei reagenti alla luce forte deve essere evitata per tutta la durata della procedura di analisi e della conservazione.

Un lavaggio insufficiente comporta una scarsa precisione e segnali di misura elevati. Dopo ogni fase di lavaggio, il liquido residuo deve essere completamente rimosso.

## 8 PREPARAZIONE

### 8.1 Preparazione dei reagenti

Tutti i componenti, compresa la piastra per microtitolazione, devono essere portati a temperatura ambiente (TA: da 18 °C a 25 °C) prima dell'uso per almeno 30 minuti. Tutti i componenti liquidi devono essere miscelati delicatamente per garantirne l'omogeneità.

#### 8.1.1 Piastra per microtitolazione

La piastra per microtitolazione è sigillata in un sacchetto di alluminio. Le strisce reattive non utilizzate devono essere sempre conservate in frigorifero e protette dall'umidità con l'essiccante nella busta di alluminio opportunamente sigillata. Se richiuse con cura, le strisce reattive possono essere utilizzate per 8 settimane dall'apertura.

#### 8.1.2 Calibratori

I calibratori sono pronti all'uso e non devono essere ulteriormente diluiti. I calibratori devono essere utilizzati per ogni saggio.

#### 8.1.3 Controlli

I controlli positivi e negativi sono pronti all'uso e non devono essere ulteriormente diluiti. I controlli devono essere utilizzati in ogni analisi. I laboratori possono anche convalidare i propri campioni di controllo e utilizzarli in alternativa.

#### 8.1.4 Diluente del campione

Il diluente del campione è pronto all'uso.

#### 8.1.5 Tampone di lavaggio

Il tampone di lavaggio è concentrato e deve essere diluito **1:10** con acqua distillata prima dell'uso (ad es. 100 mL + 900 mL). È necessario preparare una quantità sufficiente di soluzione di lavaggio. La soluzione di lavaggio diluita può essere conservata a 2 °C - 8 °C fino a 30 giorni.

#### 8.1.6 Coniugato

Il coniugato è pronto all'uso e stabile fino a 8 settimane dopo l'apertura se conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

#### 8.1.7 Substrato

Il substrato è pronto all'uso. È necessario evitare l'esposizione della soluzione del substrato alla luce.

#### 8.1.8 Soluzione d'arresto

La soluzione d'arresto è pronta all'uso.

### 8.2 Preparazione dei campioni

#### 8.2.1 Materiale campione

Si raccomanda l'uso di **siero** appena raccolto da sangue prelevato mediante venipuntura.

Si deve evitare l'uso di campioni itterici, lipemici, emolitici o contaminati da batteri. Le sostanze insolubili devono essere rimosse dal campione mediante centrifugazione. I campioni non devono essere inattivati termicamente.

#### 8.2.2 Diluizione del campione

I campioni devono essere **diluiti 1:101** (ad es. 10 µL + 1000 µL) con il diluente del campione e miscelati accuratamente. Si deve evitare la formazione di schiuma.

### 8.2.3 Conservazione dei campioni

I campioni possono essere conservati a 2 °C - 8 °C fino a tre giorni.

La conservazione a lungo termine richiede -20 °C. È necessario evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti. Per un uso multiplo, i campioni devono essere aliquotati e conservati a -20 °C.

## 9 PRESTAZIONI DEL SAGGIO

### 9.1 Schema di pipettaggio

Si raccomanda il seguente schema di pipettaggio:

	1	2	3	4
<b>A</b>	CAL 0	Campione 2		
<b>B</b>	CAL 1	Campione 3		
<b>C</b>	CAL 2	Campione 4		
<b>D</b>	CAL 3	Campione 5		
<b>E</b>	CAL 4	...		
<b>F</b>	N	...		
<b>G</b>	P	...		
<b>H</b>	Campione 1	...		

### 9.2 Procedura

È necessario rispettare i tempi e le temperature di incubazione indicati ed evitare significativi sbalzi temporali durante il pipettaggio dei campioni e dei reagenti. La piastra per microtitolazione deve essere agitata brevemente dopo l'aggiunta dei reagenti.

Fase	Descrizione
1. Aggiunta di calibratori, controlli e campioni diluiti	Aggiungere 100 µL di calibratori, controlli e campioni diluiti pronti all'uso per pozzetto.
2. Incubazione	Coprire la piastra e incubare per 60 minuti a TA.
3. Ciclo di lavaggio	Aspirare la soluzione e lavare 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio con un tempo di immersione di almeno 5 secondi ciascuno; asciugare battendo la piastra per microtitolazione su un carta assorbente per rimuovere eventuali gocce residue.
4. Aggiunta del coniugato	Aggiungere 100 µL di coniugato pronto all'uso in ogni pozzetto.
5. Incubazione	Coprire la piastra e incubare per 30 minuti a TA.
6. Ciclo di lavaggio	Aspirare la soluzione e lavare 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio con un tempo di immersione di almeno 5 secondi ciascuno; asciugare battendo la piastra per microtitolazione su un carta assorbente per rimuovere eventuali gocce residue.
7. Aggiunta di substrato	Aggiungere 100 µL di substrato pronto all'uso in ogni pozzetto.
8. Incubazione	Coprire la piastra e incubare per 15 min al buio a TA.
9. Aggiunta della soluzione d'arresto	Aggiungere 100 µL di soluzione d'arresto pronta all'uso in ogni pozzetto.
10. Analisi	Leggere la densità ottica (DO) a 450 nm rispetto a 620 o 690 nm entro 30 minuti dall'arresto della reazione.

### 9.3 Automazione

L'elaborazione automatizzata dei saggi immunologici deve essere eseguita in modo analogo all'uso manuale e convalidata dall'utente.

## 10 VALUTAZIONE DEL SAGGI

### 10.1 Tracciabilità metrologica

L'immunodosaggio viene calibrato utilizzando un campione di riferimento interno. I risultati quantitativi sono espressi in U/mL.

### 10.2 Curva di calibrazione

Per la generazione di una curva di calibrazione, i segnali ottici (densità ottica, DO) dei calibratori vengono tracciati rispetto alle loro attività anticorpali e correlati mediante un adattamento logistico a 4 parametri (4 PL). Le attività anticorpali dei campioni sconosciuti possono essere estrapolate direttamente dai loro segnali ottici utilizzando la curva di calibrazione generata.

### 10.3 Criteri di validità

I saggi sono validi solo se sono soddisfatti i seguenti criteri di validità:

- DO CAL 0 < CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4
- DO CAL 4 > 1,2
- Il controllo negativo deve essere valutato negativo.
- Il controllo positivo deve essere valutato positivo e presentare un'attività anticorpale all'interno dell'intervallo di validità indicato nel certificato di controllo qualità.

Se questi criteri non sono soddisfatti, il saggio non è valido e deve essere ripetuto.

### 10.4 Risoluzione dei problemi

In caso di saggi non validi, occorre verificare le date di scadenza e le condizioni di conservazione, i tempi e le temperature di incubazione e l'esatta calibrazione di tutti gli strumenti utilizzati. Se non è stato possibile identificare un motivo per cui il saggio non è valido, si prega di contattare il fornitore o il produttore del prodotto.

### 10.5 Intervalli di riferimento

Gli intervalli di riferimento sono indicati di seguito:

	Interpretazione
Attività anticorpale < 20 U/mL	negativo
Attività anticorpale ≥ 20 U/mL	positivo

A causa delle diverse siero prevalenze nelle singole regioni, ogni laboratorio deve verificare gli intervalli di riferimento con analisi proprie e adattarli, se necessario.

### 10.6 Interpretazione dei risultati dei saggi

Un risultato positivo del saggio indica la presenza di anticorpi specifici. Un risultato negativo indica l'assenza di anticorpi specifici, ma non esclude la possibilità di una reazione autoimmune. In caso di risultati incerti, non è possibile effettuare una valutazione affidabile.

### 10.7 Limiti del metodo

L'interpretazione dei risultati dei saggi deve sempre essere considerata in combinazione con il quadro clinico del paziente. La diagnosi non deve basarsi sui risultati di un solo metodo diagnostico. Tutti i risultati clinici e di laboratorio devono essere valutati per formulare una diagnosi. Per la conferma, è necessario eseguire ulteriori indagini.

## 11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

### 11.1 Caratteristiche delle prestazioni analitiche

#### 11.1.1 Precisione

La precisione dei risultati del saggio è stata valutata mediante la determinazione della variazione intra- e inter-saggio attraverso l'analisi di più campioni con diverse attività anticorpali.

	Precisione intra-saggio		Precisione inter-saggio	
	U/mL	CV (%)	U/mL	CV (%)
Campione 1	199	6,6	215	8,2
Campione 2	65	4,4	65	6,8
Campione 3	18	6,7	19	8,6

### 11.1.2 Intervallo di misura

L'accuratezza, l'esattezza, la precisione, la linearità e il recupero dei risultati del saggio sono stati osservati nell'intervallo di misura del saggio dal LoQ al calibratore superiore in studi completi.

I campioni con risultati del saggio superiori al calibratore superiore devono essere riportati come >max.

I campioni con risultati del saggio inferiori al LoQ devono essere indicati come <min.

Se si osservano risultati del saggio superiori al calibratore superiore, i campioni possono essere analizzati a una diluizione superiore. L'attività anticorpale risultante deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione aggiuntivo.

## 11.2 Caratteristiche delle prestazioni diagnostiche

### 11.2.1 Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità sono state valutate analizzando 116 campioni di siero di pazienti con malattia di Crohn e 75 campioni di siero di pazienti con colite ulcerosa:

	Prestazioni diagnostiche
Sensibilità	42,0 %
Specificità	92,0 %

## 12 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro* da parte di personale qualificato, autorizzato e addestrato. Tutti i componenti del saggio e i campioni umani devono essere maneggiati con cura in quanto potenzialmente pericolosi. È necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio (BPL) e a tutte le normative pertinenti.

Nel caso in cui il prodotto sia danneggiato o le informazioni sul prodotto, compresa l'etichettatura, siano errate o non corrette, si prega di contattare il produttore o il fornitore.

Questo prodotto contiene preparati di origine umana e/o animale. Qualsiasi materiale derivato da fluidi corporei umani o da organi utilizzati per la preparazione dei componenti è stato testato ed è risultato negativo all'HBsAg (Antigene di superficie del virus dell'epatite B) e agli anticorpi anti-HIV e anti-HCV. Tuttavia, tutti i componenti e tutti i campioni dei pazienti devono essere trattati come potenzialmente pericolosi in conformità alle leggi nazionali e alle linee guida appropriate sulla sicurezza biologica.

Poiché il prodotto contiene materiali potenzialmente pericolosi, è necessario seguire le seguenti precauzioni: Non fumare, mangiare o bere durante la manipolazione del materiale del kit o dei campioni. Evitare il contatto diretto con il materiale del kit o con i campioni indossando guanti protettivi, camice da laboratorio e occhiali di sicurezza. Non pipettare mai il materiale per bocca. Pulire prontamente le fuoriuscite e lavare accuratamente la superficie interessata con un decontaminante. Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.

Alcuni reagenti contengono ProClin (< 1,0%) come conservante, possono causare sensibilizzazione cutanea (H317) e non devono essere ingeriti o lasciati entrare in contatto con la pelle o le mucose (P280, P333+P313).

È necessario osservare le informazioni contenute nella scheda di sicurezza relative ai possibili pericoli, alle misure di primo soccorso, alle misure da adottare in caso di rilascio involontario di grandi quantità, alla manipolazione e allo stoccaggio, ai dispositivi di protezione individuale, alle informazioni sullo smaltimento e alle informazioni sulla tossicologia.

Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utilizzatore e/o il paziente.

## 13 SMALTIMENTO

Per la decontaminazione e lo smaltimento è necessario attenersi alle raccomandazioni del CDC e alle linee guida e normative ambientali locali e nazionali pertinenti. I campioni, i materiali potenzialmente contaminati e i rifiuti infettivi devono essere decontaminati, ad esempio in autoclave per 20 min a 121 °C.

## 14 RIFERIMENTI

- Conrad K, Schmechta H, Klafki A, Lobeck G, Uhlig HH, Gerdi S, Henker J: Serological differentiation of inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastro & Hepatol.* 2002, 14, 129 – 35.
- Vermeire S: Serological Diagnosis in IBD. *IBDM* 2002, 3, 82 – 9.
- Degenhardt F, Dirmeier A, Lopez R, Lang S, Kunst C, Roggenbuck D, Reinhold D, Szymczak S, Rogler G, Klebl F, Franke A, Rieder F. Serologic Anti-GP2 Antibodies Are Associated with Genetic Polymorphisms, Fibrostenosis, and Need for Surgical Resection in Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2016, 22, 2648 – 57.

## 1 USO PREVISTO

El ASCA IgA ELISA es un inmunoensayo cuantitativo para la determinación de anticuerpos IgA contra *Saccharomyces cerevisiae* en suero humano.

El ASCA IgA ELISA está pensada como una ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Crohn junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

El inmunoensayo está diseñado para uso manual por profesionales en el diagnóstico *in vitro*.

## 2 RELEVANCIA DEL DIAGNÓSTICO

Las enfermedades inflamatorias intestinales inespecíficas, como la enfermedad de Crohn (EC) o enteritis regional y la colitis ulcerosa (CU), se caracterizan por una etiología desconocida, así como por procesos inflamatorios crónicos-remitentes del intestino. Mientras que la inflamación de la CU se limita a la mucosa y submucosa del colon y el recto, la EC muestra una inflamación ampliamente extendida del tracto gastrointestinal con formación de granulomas.

El riesgo de desarrollar una de estas enfermedades está fuertemente influenciado por factores inmunológicos, genéticos, infecciosos y ambientales.

El diagnóstico diferencial de las enfermedades inflamatorias del intestino con la diarrea crónica, el dolor abdominal recurrente, la colitis infecciosa y la anorexia, así como la diferenciación de la EC con la colitis ulcerosa, sigue siendo un gran desafío.

La determinación de anticuerpos IgA e IgG contra *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería) se ha descrito recientemente como un importante marcador serológico para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Crohn.

Hasta el 70% de los pacientes con EC presentan niveles de anticuerpos contra *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque la causa de su aparición no está clara, los anticuerpos contra *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) están fuertemente asociados a procesos inflamatorios del intestino.

En combinación con la detección de autoanticuerpos contra los antígenos citoplasmáticos antineutrófilos atípicos (aANCA), que se encuentran principalmente en pacientes con colitis ulcerosa, los ASCA son un parámetro válido para la diferenciación de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

## 3 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) es un inmunoensayo para la determinación de anticuerpos específicos. Las tiras de la placa de microtitulación están recubiertas con antígenos específicos de la prueba. Si los anticuerpos están presentes en la muestra del paciente, se unen a los antígenos. Un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa detecta el inmunocomplejo generado. Un sustrato incoloro se convierte en el producto coloreado. La intensidad de la señal del producto de la reacción es proporcional a la actividad del anticuerpo en la muestra. Después de parar de la reacción, la intensidad de la señal del producto de reacción se mide fotométricamente.

#### 4 COMPONENTES DE LA PRUEBA

Componente	Descripción
<b>Placa de microtitulación</b> <b>A</b> <b>Ag   96</b> 1 pieza	12 tiras de microtitulación desprendibles (lista para usar), 8 pocillos por tira, cada pocillo recubierto con manano de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Calibrador</b> <b>0 - 4</b> <b>CAL</b> 5 x 1 mL, tapa blanca	Diluciones coloreadas de suero humano (listo para usar; contiene ProClin 950) <i>Las actividades de los anticuerpos se indican en el certificado de CC.</i>
<b>Control negativo</b> <b>N</b> <b>CONTROL   -</b> 1 x 1 mL, tapa verde	Dilución coloreada de suero humano (listo para usar; contiene ProClin 950) <i>La actividad de los anticuerpos se indica en el certificado de CC.</i>
<b>Control positivo</b> <b>P</b> <b>CONTROL   +</b> 1 x 1 mL, tapa roja	Dilución coloreada de suero humano (listo para usar; contiene ProClin 950) <i>La actividad de los anticuerpos se indica en el certificado de CC.</i>
<b>Diluyente de la muestra</b> <b>C</b> <b>DIL</b> 1 x 100 mL, tapa negra	Solución coloreada (listo para usar; contiene ProClin 950)
<b>Tampón de lavado</b> <b>B</b> <b>BUF WASH 10x</b> 1 x 100 mL, tapa blanca	Solución concentrada (10x; contiene ProClin 950)
<b>Conjugado IgA</b> <b>D</b> <b>CONJ</b> 1 x 15 mL, tapa violeta	Solución coloreada de anticuerpo policlonal anti-IgA humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (listo para usar; contiene ProClin 950)
<b>Sustrato</b> <b>E</b> <b>SOLN   TMB</b> 1 x 15 mL, tapa azul	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (listo para usar)
<b>Solución de parada</b> <b>F</b> <b>H2SO4   0.25M</b> 1 x 15 mL, tapa amarilla	Ácido sulfúrico 0,25 M (lista para usar)
<b>Película adhesiva</b> 2 piezas	-
<b>Certificado de CC</b> 1 pieza	-
<b>Instrucciones de uso</b> 1 pieza	-

#### 5 MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROPORCIONADOS

- Equipos de laboratorio comunes
- Pipetas de precisión (5 - 1000 µL), pipetas multicanal (100 - 1000 µL) y puntas de pipeta desechables
- Cilindros graduados (100 - 1000 mL)
- Tubos de muestra para la preparación de diluciones
- Mezclador de vórtice u otros rotadores
- Lavador de placas de microtitulación o peine de lavado
- Lector de microplacas con filtros ópticos para 450 nm y 620 nm o 690 nm
- Papel absorbente
- Agua destilada o desionizada

#### 6 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Una vez recibidos, todos los componentes de la prueba deben almacenarse entre 2 °C y 8 °C, preferiblemente en su empaque original. Si se almacenan correctamente en sus empaques originales, todos los componentes son estables hasta su fecha de caducidad.

Todos los componentes son estables durante al menos 2 meses después de su apertura si se almacenan correctamente entre 2 °C y 8 °C.

## 7 INFORMACIÓN GENERAL

Este producto es para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*. Las instrucciones de uso deben leerse cuidadosamente antes del uso. Estas son válidas solo para el presente producto con la composición dada y deben seguirse estrictamente para garantizar resultados confiables de las pruebas. Las desviaciones pueden conducir a resultados erróneos. Los componentes no deben cambiarse por reactivos de otras pruebas de diferentes lotes o fabricantes.

Debe evitarse la contaminación de los reactivos mediante el uso de técnicas asépticas al extraer alícuotas de los viales. Después de su uso, los viales de reactivos deben cerrarse herméticamente con sus correspondientes tapones.

La contaminación cruzada de las muestras o los reactivos puede dar lugar a resultados inconsistentes de las pruebas y debe evitarse mediante el uso de técnicas de pipeteo consistentes.

Debe evitarse la exposición de los reactivos a la luz intensa durante todo el procedimiento de ensayo y el almacenamiento.

Un lavado insuficiente dará lugar a una mala precisión y a elevadas señales de medición. Después de cada paso de lavado, cualquier líquido residual debe eliminarse por completo.

## 8 PREPARACIÓN

### 8.1 Preparación de reactivos

Todos los componentes, incluida la placa de microtitulación, deben estar a temperatura ambiente (TA: 18 °C a 25 °C) antes de su uso durante al menos 30 min. Todos los componentes líquidos deben mezclarse suavemente para garantizar la homogeneidad.

#### 8.1.1 Placa de microtitulación

La placa de microtitulación está sellada en una bolsa de aluminio. Las tiras reactivas no utilizadas deben almacenarse refrigeradas y protegidas de la humedad con el desecante dentro de la bolsa de aluminio debidamente sellada. Las tiras reactivas bien selladas se pueden utilizar durante 8 semanas después de su apertura.

#### 8.1.2 Calibradores

Los calibradores están listos para usar y no deben diluirse. Los calibradores deben utilizarse en cada prueba.

#### 8.1.3 Controles

Los controles positivo y negativo están listos para usar y no deben diluirse. Los controles deben utilizarse en cada prueba. El laboratorio también puede validar sus propias muestras de control y usarlas alternativamente.

#### 8.1.4 Diluyente de la muestra

El diluyente de la muestra está listo para usar.

#### 8.1.5 Tampón de lavado

El tampón de lavado está concentrado y debe diluirse **1:10** con agua destilada antes de su uso (por ejemplo, 100 mL + 900 mL). Debe prepararse una cantidad suficiente de solución de lavado. La solución de lavado preparada puede almacenarse entre 2 °C y 8 °C hasta por 30 días.

#### 8.1.6 Conjugado

El conjugado está listo para usar y es estable hasta por 8 semanas después de su apertura si se almacena entre 2 °C y 8 °C.

#### 8.1.7 Sustrato

El sustrato está listo para usar. Debe evitarse la exposición del sustrato a fuentes de luz intensa.

#### 8.1.8 Solución de parada

La solución de parada está lista para usar.

### 8.2 Preparación de las muestras

#### 8.2.1 Material de muestra

Se recomienda el uso de **suero** recién extraído de sangre por punción venosa.

Debe evitarse el uso de muestras ictericas, lipémicas, hemolíticas o contaminadas con bacterias. Las sustancias insolubles deben eliminarse de la muestra mediante centrifugación. Las muestras no deben ser inactivadas térmicamente.

#### 8.2.2 Dilución de la muestra

Las muestras deben **diluirse 1:101** (por ejemplo, 10 µL + 1000 µL) con Diluyente de la muestras y mezclarse bien. Debe evitarse la formación de espuma.

#### 8.2.3 Almacenamiento de muestras

Las muestras pueden conservarse entre 2 °C y 8 °C hasta por tres días. El almacenamiento a largo plazo requiere -20 °C. Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas. Para uso múltiple, las muestras deben dividirse en alícuotas y conservadas a -20 °C.



## 9 RENDIMIENTO DE LA PRUEBA

### 9.1 Esquema de pipeteo

El siguiente esquema de pipeteo es recomendado:

	1	2	3	4
<b>A</b>	CAL 0	Muestra 2		
<b>B</b>	CAL 1	Muestra 3		
<b>C</b>	CAL 2	Muestra 4		
<b>D</b>	CAL 3	Muestra 5		
<b>E</b>	CAL 4	...		
<b>F</b>	N	...		
<b>G</b>	P	...		
<b>H</b>	Muestra 1	...		

### 9.2 Procedimiento

Deben respetarse los tiempos y temperaturas de incubación indicados, y deben evitarse significativos cambios de tiempo durante el pipeteo de muestras y reactivos. La placa de microtitulación debe agitarse brevemente después de agregar los reactivos.

Paso	Descripción
1. Adición de calibradores, controles y muestras diluidas	Agregue 100 µL de calibradores y controles listos para usar y muestras diluidas por pocillo
2. Incubación	Cubra la placa e Incube durante 60 min a TA
3. Ciclos de lavados	Aspire la solución y lave 3 veces con 300 µL de solución de lavado con un tiempo de remojo de al menos 5 s cada uno; secar golpeando la placa de microtitulación sobre un papel absorbente para eliminar cualquier gota residual
4. Adición del conjugado	Agregue 100 µL de conjugado listo para usar en cada pocillo
5. Incubación	Cubra la placa e Incube durante 30 min a TA
6. Ciclos de lavados	Aspire la solución y lave 3 veces con 300 µL de solución de lavado con un tiempo de remojo de al menos 5 s cada uno; secar golpeando la placa de microtitulación sobre un papel absorbente para eliminar cualquier gota residual
7. Adición de sustrato	Agregue 100 µL de sustrato listo para usar en cada pocillo
8. Incubación	Cubra la placa e Incube durante 15 min en la oscuridad a TA
9. Adición de la solución de parada	Agregue 100 µL de solución de parada lista para usar en cada pocillo
10. Análisis	Lea la densidad óptica (DO) a 450 nm frente a 620 o 690 nm en 30 min después de detener la reacción

### 9.3 Automatización

El procesamiento automatizado de los inmunoensayos debe realizarse de forma análoga al uso manual y debe ser validado por el usuario.

## 10 EVALUACIÓN DE LA PRUEBA

### 10.1 Trazabilidad metrológica

El inmunoensayo se calibra utilizando una muestra de referencia interna. Los resultados cuantitativos se expresan en U/mL.

### 10.2 Curva de calibración

Para generar una curva de calibración, las señales ópticas (densidad óptica, DO) de los calibradores se representan frente a sus actividades de anticuerpos y se correlacionan mediante un ajuste logístico de 4 parámetros (4 PL). Las actividades de anticuerpos de muestras desconocidas se pueden derivar directamente de sus señales ópticas mediante el uso de la curva de calibración generada.

### 10.3 Criterios de Validez

Las pruebas son válidas solo si cumplen con los siguientes criterios de validez:

- DO CAL 0 < CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4;
- DO CAL 4 > 1,2;
- El control negativo debe ser valorado como negativo;
- El control positivo debe ser valorado como positivo y presentar una actividad de anticuerpos dentro del rango de validez indicado en el certificado de CC.

Si no se cumplen estos criterios, la prueba no es válida y debe repetirse.

### 10.4 Solución de problemas

En caso de una prueba no válida, se deben verificar las fechas de caducidad y las condiciones de almacenamiento, los tiempos y temperaturas de incubación y la calibración precisa de todos los instrumentos utilizados. Si no se pudo identificar el motivo de invalidez de la prueba, comuníquese con el proveedor o fabricante del producto.

### 10.5 Rangos de referencia

Los rangos de referencias son indicados continuación:

	Interpretación
Actividad de los anticuerpos < 20 U/mL	negativo
Actividad de los anticuerpos ≥ 20 U/mL	positivo

Como consecuencia de las diferentes seroprevalencias en cada región, cada laboratorio debe verificar sus rangos de referencia mediante su propio análisis y adaptarlos, si es necesario.

### 10.6 Interpretación de los resultados de las pruebas

Un resultado positivo indica la presencia de anticuerpos específicos. Un resultado negativo indica la ausencia de anticuerpos específicos, pero no excluye la posibilidad de una reacción autoinmune. En caso de un resultado incierto de la prueba, no es posible una evaluación confiable.

### 10.7 Limitaciones del método

La interpretación de los resultados de las pruebas debe considerarse siempre en combinación con el cuadro clínico del paciente. El diagnóstico no debe basarse en los resultados de un único método diagnóstico. Todos los hallazgos clínicos y de laboratorio deben evaluarse para establecer un diagnóstico. Para confirmarlo, se deben realizar más investigaciones.

## 11 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### 11.1 Características de rendimiento analítico

#### 11.1.1 Precisión

La precisión de los resultados de la prueba se evaluó mediante la determinación de la variación intra- e inter-ensayo, mediante el análisis de múltiples muestras con diferentes actividades de anticuerpos.

	Precisión intraensayo		Precisión interensayo	
	U/mL	CV (%)	U/mL	CV (%)
Muestra 1	199	6,6	215	8,2
Muestra 2	65	4,4	65	6,8
Muestra 3	18	6,7	19	8,6

### 11.1.2 Rango de medición

Se han observado exactitud, veracidad, precisión, linealidad y recuperación confiables de los resultados de las pruebas dentro del rango de medición del ensayo desde el LoQ hasta el calibrador superior en estudios exhaustivos.

Las muestras con resultados por encima del calibrador superior deben informarse como >máx.

Las muestras con resultados por debajo del LoQ deben informarse como <min.

Si se observan resultados por encima del calibrador superior, las muestras pueden analizarse a una dilución más alta. La actividad de anticuerpos resultante debe multiplicarse por el factor de dilución adicional.

## 11.2 Características de rendimiento del diagnóstico

### 11.2.1 Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad y la especificidad se evaluaron mediante el análisis de 116 muestras de suero de pacientes con enfermedad de Crohn y 75 muestras de suero de pacientes con colitis ulcerosa:

	Rendimiento del diagnóstico
Sensibilidad	42,0 %
Especificidad	92,0 %

## 12 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

El producto está diseñado exclusivamente para uso en diagnóstico *in vitro* por personal calificado, autorizado y capacitado. Todos los componentes de la prueba y las muestras humanas deben manipularse con cuidado, ya que son potencialmente peligrosos. Se deben cumplir las buenas prácticas de laboratorio (BPL) y todas las reglamentaciones pertinentes.

En caso de que el producto esté dañado o la información del producto, incluido el etiquetado, sea errónea o incorrecta, póngase en contacto con el proveedor o fabricante.

Este producto contiene preparados de origen humano y/o animal. Cualquier material derivado de fluidos corporales humanos u órganos utilizados para la preparación de componentes, se analizó y resultó negativo para HBsAg (antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B) y anticuerpos anti-VIH y anti-VHC. Sin embargo, todos los componentes y todas las muestras de pacientes deben manipularse como potencialmente peligrosos de acuerdo con las leyes nacionales y las directrices adecuadas sobre seguridad biológica.

Dado que el producto contiene materiales potencialmente peligrosos, deben seguirse las siguientes precauciones: No fume, coma ni beba mientras se manipula el material del kit o las muestras. Evite el contacto directo con el material del kit o las muestras utilizando guantes de protección, bata de laboratorio y gafas de seguridad. Nunca pipetee el material con la boca. Limpie los derrames rápidamente y lave bien la superficie afectada con un descontaminante. Lávese bien las manos después de su uso.

Algunos de los reactivos contienen ProClin (< 1,0 %) como conservante, pueden causar sensibilización de la piel (H317) y no deben ser ingeridos ni deben entrar en contacto con la piel o las mucosas (P280, P333+P313).

Debe observarse la información de la ficha de datos de seguridad sobre posibles peligros, medidas de primeros auxilios, medidas en caso de liberación involuntaria de grandes cantidades, manipulación y almacenamiento, equipo de protección personal, información sobre desecho, así como información sobre toxicología.

Cualquier incidencia grave que haya ocurrido en relación con el producto deberá ser comunicada al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

## 13 DESECHO

Para la descontaminación y desecho deben cumplir las recomendaciones del CDC, así como las directrices y reglamentos medioambientales locales y nacionales pertinentes. Las muestras, los materiales potencialmente contaminados y los residuos infecciosos deben descontaminarse, por ejemplo, mediante autoclave durante 20 min a 121 °C.

## 14 REFERENCIAS

1. Conrad K, Schmechta H, Klafki A, Lobeck G, Uhlig HH, Gerdi S, Henker J: Serological differentiation of inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastro & Hepatol.* 2002, 14, 129 – 35.
2. Vermeire S: Serological Diagnosis in IBD. *IBDM* 2002, 3, 82 – 9.
3. Degenhardt F, Dirmeier A, Lopez R, Lang S, Kunst C, Roggenbuck D, Reinhold D, Szymczak S, Rogler G, Klebl F, Franke A, Rieder F. Serologic Anti-GP2 Antibodies Are Associated with Genetic Polymorphisms, Fibrostenosis, and Need for Surgical Resection in Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2016, 22, 2648 – 57.

**SYMBOLS USED**

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
<b>IVD</b>	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
<b>REF</b>	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
<b>LOT</b>	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks*	Biologische Risiken*	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
<b>RUO</b>	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité