

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

ASCA IgG ELISA

Enzyme Immunoassay for the qualitative and quantitative determination of IgG antibodies to Saccharomyces cerevisiae in human serum



DE4280



96

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
 Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
 Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----|---|----|
| 1 | INTENDED USE | 3 |
| 2 | PRINCIPLE OF THE TEST..... | 3 |
| 3 | PATIENT SAMPLES..... | 4 |
| 4 | TEST COMPONENTS FOR 96 DETERMINATIONS..... | 4 |
| 5 | ASSAY PROCEDURE..... | 5 |
| 6 | DATA PROCESSING | 6 |
| 7 | REFERENCE VALUES..... | 7 |
| 8 | CHARACTERISTIC ASSAY DATA..... | 8 |
| 9 | INCUBATION SCHEME | 9 |
| 10 | SAFETY PRECAUTIONS..... | 10 |
| | | |
| 1 | ANWENDUNG | 11 |
| 2 | TESTPRINZIP..... | 11 |
| 3 | PATIENTENPROBEN..... | 12 |
| 4 | TESTKOMPONENTEN FÜR 96 BESTIMMUNGEN..... | 12 |
| 5 | TESTDURCHFÜHRUNG..... | 14 |
| 6 | BERECHNUNG DER ERGEBNISSE | 14 |
| 7 | REFERENZWERTE..... | 15 |
| 8 | TESTCHARAKTERISTIKA | 16 |
| 9 | ASSAY - SCHEMA | 17 |
| 10 | ALLGEMEINE HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN | 18 |
| | | |
| | SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS | 19 |

1 INTENDED USE

ASCA IgG is used for the quantitative and qualitative determination of IgG antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in human serum.

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.

DEMEDIATEC offers two innovative serological markers for inflammatory bowel diseases: **ASCA IgA** and **ASCA IgG**. Both assays employ the same assay scheme and predilution maximizing laboratory efficiency.

- 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 14:129-135
- Vermeire S: Serological Diagnosis in IBD. IBDM 2002 3:82-89

2 PRINCIPLE OF THE TEST

ASCA IgG is an enzyme immunoassay for the quantitative determination of IgG antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in human serum.

Autoantibodies of the diluted patient samples, the control, and calibrators react with mannan (cell surface component of baker's yeast) immobilized on the solid phase of a microtiter plate. ASCA IgG guarantees the specific binding of anti-*Saccharomyces cerevisiae* IgG antibodies of the specimen under investigation by employing purified mannan of *Saccharomyces cerevisiae* for coating. Following an incubation period of 60 min at room temperature, unbound sample components are removed by a wash step.

The bound IgG antibodies react specifically with anti-human-IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP). Within the incubation period of 30 min at RT, excessive conjugate is separated from the solid-phase immune complexes by the following wash step.

HRP converts the colorless substrate solution of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) added into a blue product. The enzyme reaction is stopped by dispensing an acidic solution into the wells after 15 min at room temperature turning the solution from blue to yellow.

The optical density (OD) of the solution at 450 nm is directly proportional to the amount of specific antibodies bound. The standard curve is established by plotting the antibody concentrations of the calibrators (x-axis) and their corresponding OD values (y-axis) measured. The concentration of antibodies of the specimen is directly read off the standard curve. Evaluating the test by a semi-quantitative method is also possible.

3 PATIENT SAMPLES

3.1 Specimen collection and storage

Blood is taken by venipuncture. Serum is separated after clotting by centrifugation. Lipaemic, hemolytic and contaminated samples should not be used.

The samples may be kept at 2 - 8 °C for up to three days. Long-term storage requires - 20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided. If samples are to be used for several assays, initially aliquot samples and keep at - 20 °C.

3.2 Preparation before use

Allow samples to reach room temperature prior to assay. Take care to agitate serum samples gently in order to ensure homogeneity.

Note: *Patient samples have to be diluted 1 + 100 (v/v),
e.g. 10 µl sample + 1.0 ml sample diluent (C), prior to assay.*

4 TEST COMPONENTS FOR 96 DETERMINATIONS

| | | |
|--|--|--|
| A (Ag 96) | Microtiter plate 12 breakable strips per 8 wells (total 96 individual wells) coated with mannan (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | 1 vacuum sealed with desiccant; 2 foils |
| B (BUF WASH) (10X) | Concentrated wash buffer sufficient for 1000 ml solution each | 100 ml concentrate capped white |
| C (DIL) | Sample diluent | 100 ml ready for use capped black |
| D (CONJ) | Conjugate containing anti-human-IgG - (sheep) coupled with horse radish peroxidase | 15 ml ready for use capped red |
| E (SOLN TMB) | Substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in citrate buffer containing hydrogen peroxide | 15 ml ready for use capped blue |
| F (acidic solution) (0.5 N) | Stop solution 0.5 N acidic solution | 15 ml ready for use capped yellow |
| 0 - 4 (CAL) | Calibrators (diluted serum) conc.: 1, 10, 30, 100, 300 U/ml | 1 ml each ready for use capped white |
| P (CONTROL) (+) | Positive control (diluted serum) conc.: see leaflet enclosed | 1 ml ready for use capped red |

4.1 Materials required in addition

- micropipette 100 - 1000 µl
- micropipette 10 - 100 µl
- multi-channel pipette 50 - 200 µl
- trough for multi-channel pipette
- 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer
- microplate reader with optical filters for 450 nm and 620 nm or 690 nm
- graduated cylinders
- distilled or de-ionized water

4.2 Size and storage

ASCA IgG has been designed for 96 determinations.

The expiry date of each component is reported on its respective label that of the complete kit on the box labels.

Upon receipt, all components of the ASCA IgG have to be kept at 2 - 8 °C, preferably in the original kit box.

After opening all kit components are stable for at least 2 months, provided proper storage.

4.3 Preparation before use

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay.

The microtiter plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed microplate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Prepare a sufficient amount of **wash solution** by diluting the concentrated wash buffer 10 times (1 + 9) with de-ionized or distilled water. For example, dilute 8 ml of the concentrate with 72 ml of distilled water. The wash solution prepared is stable up to 30 days at 2 - 8 °C.

Make sure the soak time of the wash buffer in the wells is at least 5 seconds per wash cycle.

Avoid exposure of the TMB substrate solution to light!

5 ASSAY PROCEDURE

- **Dilute patient sera with sample diluent (C) 1 + 100 (v/v), e.g. 10 µl serum + 1.0 ml sample diluent (C).**
- **Avoid any time shift during pipetting of reagents and samples**

1. Bring all reagents to room temperature (18 °C - 25 °C) before use. Mix gently without causing foam.
2. Dispense
100 µl calibrators 1 – 4 (CAL 0 optionally, quantitative) or
100 µl calibrator 1 (semi-quantitative)
100 µl positive control (P)
100 µl diluted patient samples into the respective wells.
3. Cover plate, incubate **60 min** at room temperature (18 °C - 25 °C).
4. Decant, then wash each well **three** times using **300 µl** wash solution (made of B).
5. Add **100 µl** of conjugate (D) solution to each well.
6. Cover plate, incubate **30 min** at room temperature (18 °C - 25 °C).
7. Decant, then wash each well **three** times using **300 µl** wash solution (made of B).
8. Add **100 µl** of substrate (E) to each well.
9. Cover plate, incubate **15 min protected from light** at room temperature (18 °C - 25 °C).
10. Add **100 µl** of stop solution (F) to each well and mix gently.
11. Read the OD at **450 nm** versus 620 or 690 nm within 30 min after adding the stop solution.

6 DATA PROCESSING

ASCA IgG allows both the quantitative and semi-quantitative evaluation of the results.

6.1 Quantitative evaluation

We recommend log / lin processing for best results.

The standard curve is established by plotting the mean OD-values of the calibrators 1 - 4 (CAL 0 optionally) on the ordinate, y-axis, (lin. scale) versus their respective ASCA IgG-concentrations on the abscissa, x-axis, (log. scale).

Anti-Saccharomyces cerevisiae concentrations of the unknown samples are directly read off in U/ml against the respective OD values.

Using the recommended dilution of 1 + 100 (v/v) for patient's sera, no correction factor is necessary, as all other components of the kit are supplied accordingly.

6.2 Semi-quantitative evaluation

Results can be calculated semi-quantitatively calculating the binding index BI (ratio) between the optical density of an unknown sample and the optical density of calibrator 1 (**10 U/ml**) multiplied by a **factor 2**.

$$BI = OD_{\text{sample}} / (OD_{\text{calibrator 1 (10 U/ml)}} \times 2)$$

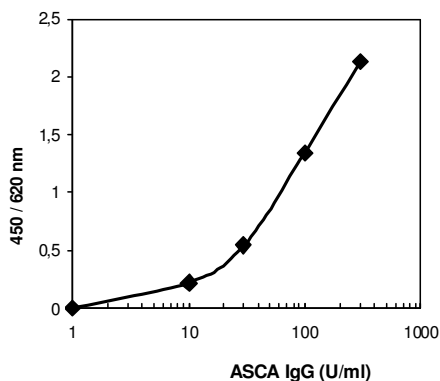
Both evaluation variants of ASCA IgG may be achieved also with computer assisted analysis software intergrated in the photometers.

Example of typical assay results (quantitative)

| well | OD (a) | OD (b) | OD (mean) | U/ml |
|--------------|--------|--------|-----------|------|
| Calibrator 0 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 1 |
| Calibrator 1 | 0.217 | 0.223 | 0.220 | 10 |
| Calibrator 2 | 0.537 | 0.550 | 0.543 | 30 |
| Calibrator 3 | 1.334 | 1.354 | 1.344 | 100 |
| Calibrator 4 | 2.100 | 2.162 | 2.131 | 300 |
| Patient 1 | 1.192 | 1.204 | 1.198 | 85 |

The above mentioned calibrator concentrations are only an example for a typical standard curve. They can change from lot to lot.

TYPICAL STANDARD CURVE (example)



Specimens with an OD > calibrator 4 should be retested in a greater sample dilution. The results have to be multiplied with the chosen dilution factor.

6.3 Test validity

The test run is valid if:

- the mean OD of the calibrator 1 is ≤ 0.5
- the mean OD of the calibrator 4 is ≥ 1.2

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is followed correctly (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

7 REFERENCE VALUES

| ASCA IgG | U/ml | BI |
|----------|-----------|------------|
| positive | ≥ 20 | ≥ 1.0 |
| negative | < 20 | < 1.0 |

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges for serum ASCA IgG antibody levels as usually done for other diagnostic parameters, too. Therefore, the above mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

7.1 Limitations of Method

Healthy individuals should be tested negative by the ASCA IgG. However, ASCA IgG antibody positive apparently healthy persons do occur.

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. Physicians are supposed to consider all clinical and laboratory findings possible to state a diagnosis.

8 CHARACTERISTIC ASSAY DATA

8.1 Calibration

Due to the lack of an international reference material the ASCA IgG is calibrated in arbitrary units (U/ml).

8.2 Diagnostic sensitivity and specificity

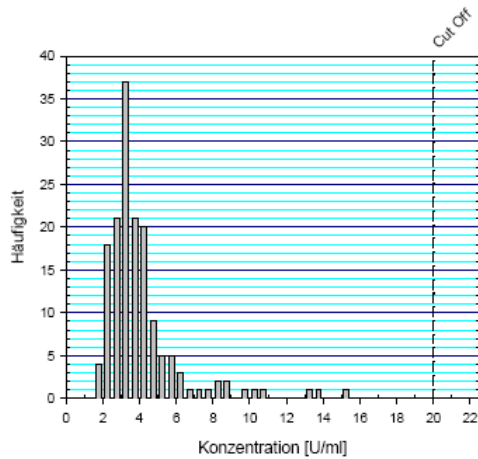
The diagnostic sensitivity and specificity of ASCA IgG and IgA (DE4279), were determined by testing 82 patients with Chrohn`s disease, 65 patients with ulcerative colitis, 101 patients with celiac disease, 33 patients with PBC, 44 patients with SLE, and 250 apparently healthy blood donors.

Diagnostic sensitivity: 50%

Diagnostic specificity: 94%

8.3 Frequency distribution

156 normal sera (without clinical symptoms) were tested ASCA IgG. All sera were found with concentrations below the cut-off (20 U/ml). This corresponds to a specificity of 100 %.



8.4 Precision

| Intraassay Variance (n=8) | | Interassay Variance (n=3 x16) | |
|---------------------------|------|-------------------------------|------|
| (IU/ml) | CV % | (IU/ml) | CV % |
| 193 | 2.08 | 196 | 3.62 |
| 134 | 3.74 | 140 | 2.06 |
| 78 | 2.76 | 81 | 1.79 |
| 42 | 1.95 | 43 | 1.59 |
| 23 | 1.11 | 23 | 0.84 |

9 INCUBATION SCHEME

Dilute patients sample★ 10 µl serum + 1.0 ml sample diluent (C)

★This dilution can also be used in the ASCA IgA (DE4279)

| | | | | |
|----|--|-------------|---------|--------|
| 1 | Bring all ready for use reagents to room temperature (18 °C - 25 °C) before use. | | | |
| | | calibrators | control | sera |
| 2 | Pipette Calibrators (0 - 4) or Calibrator 1 Positive Control (P) prediluted 1 + 100 patient sera | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| 3 | Incubate 60 minutes at room temperature (18 °C - 25 °C) | | | |
| 4 | Wash Decant, Dispense 3 x 300 µl (made of B) | | | |
| 5 | Pipette conjugate (D) | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| 6 | Incubate 30 minutes at room temperature (18 °C - 25 °C) | | | |
| 7 | Wash Decant, Dispense 3 x 300 µl (made of B) | | | |
| 8 | Pipette substrate (E) | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| 9 | Incubate protected from light 15 minutes at room temperature (18 °C - 25 °C) | | | |
| 10 | Pipette stop solution (F) | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| 11 | Measure 450 nm versus 620 (690) nm | | | |

10 SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro use only.** Follow the working instructions carefully. DEMEDITEC and its authorized distributors shall not be liable for damages indirectly or consequentially brought about by changing or modifying the procedure indicated. The kit should be performed by trained technical staff only.
- The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. The same relates to the stability stated for reconstituted reagents.
- Do not use or mix reagents from different lots.
- Do not use reagents from other manufacturers.
- Avoid time shift during pipetting of reagents.
- All reagents should be kept at 2 - 8 °C before use in the original shipping container.
- Some of the reagents contain small amounts of Thimerosal (< 0.1 % w/v) and Kathon (1.0 % v/v) as preservatives. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucosa.
- Source materials derived from human body fluids or organs used in the preparation of this kit were tested and found negative for HBsAg and HIV as well as for HCV antibodies. However, no known test guarantees the absence of such viral agents. Therefore, handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.
- Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should be observed:
 - Do not smoke, eat or drink while handling kit material,
 - Always use protective gloves,
 - Never pipette material by mouth,
 - Wipe up spills promptly, washing the affected surface thoroughly with a decontaminant.

1 ANWENDUNG

ASCA IgG ist ein Reagenziensatz zur quantitativen bzw. semi-quantitativen Bestimmung von IgG Antikörpern gegen Mannan von *Saccharomyces cerevisiae* in humanem Serum.

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.

DEMEDIATEC bietet für die Bestimmung von ASCA IgA und IgG zwei innovative Testbestecke an, die durch ein kongruentes Assayschema und universell einsetzbarer Probenverdünnung den Laboraufwand minimieren.

- 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 14:129-135
- Vermeire S: Serological Diagnosis in IBD. *IBDM* 2002 3:82-89

2 TESTPRINZIP

ASCA IgG ist ein Reagenziensatz zur quantitativen Bestimmung von IgG Antikörpern gegen Mannan der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in Serum.

Die ASCA in den Kalibratoren, der Kontrolle und verdünnten Patientenproben reagieren im ersten Reaktionsschritt mit dem an der festen Phase gebundenen Mannan von *Saccharomyces cerevisiae*. Nicht-gebundene Serumkomponenten werden nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) durch einen Waschschrift entfernt.

Die gebundenen Antikörper reagieren im zweiten Reaktionsschritt spezifisch mit anti-human-IgG Antikörpern, die an Meerrettichperoxidase (POD) gekoppelt sind. Überschüssige Konjugatmoleküle werden nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) von den an der festen Phase gebundenen Immunkomplexen durch einen Waschschrift getrennt.

Die POD setzt im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Endprodukt um. Diese Reaktion wird nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) durch Zugabe einer sauren Stopplösung abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt.

Die bei 450 nm gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Antikörper direkt proportional. Aus den OD-Werten der Kalibratoren und deren Antikörperkonzentrationen wird eine Standardkurve erstellt. Die unbekannt Patientewerte werden an dieser Standardkurve direkt abgelesen. Der Test kann auch semi-quantitativ ausgewertet werden.

3 PATIENTENPROBEN

3.1 Gewinnung und Lagerung

Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation isolieren. Lipämische, hämolytische und kontaminierte Proben dürfen nicht verwendet werden.

Die Lagerung ist bis zu 3 Tagen bei 2 - 8 °C möglich, darüber hinaus müssen die Proben bei - 20 °C eingefroren werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden, ggf. sollte vor dem Einfrieren aliquotiert werden.

3.2 Vorbereitung und Verwendung

Vor dem Einsatz im ASCA IgG werden die Proben auf Raumtemperatur gebracht. Grundsätzlich sollte durch kurzes Aufschütteln eine entsprechende Homogenität gesichert werden.

Achtung: Die Patientenproben müssen vor Einsatz im Test 1 + 100 (v/v) verdünnt werden, z. B. **10 µl Probe + 1,0 ml Probenverdünner C** (Kalibratoren sind bereits entsprechend vorverdünnt).

4 TESTKOMPONENTEN FÜR 96 BESTIMMUNGEN

| | | |
|--|---|---|
| A (Ag 96) | Mikrotiterplatte mit 12 teilbaren Streifen zu je 8 Kavitäten (insgesamt 96) beschichtet mit Mannan von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 1, vakuumversiegelt mit Trockenbeutel, 2 selbstklebende Folien |
| B (BUF WASH) (10X) | Waschpuffer, 10-fach für 1000 ml Lösung | 100 ml Konzentrat weiße Kappe |
| C (DIL) | Probenverdünner | 100 ml gebrauchsfertig schwarze Kappe |
| D (CONJ) | Konjugat enthält anti-human-IgG vom Schaf, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase | 15 ml gebrauchsfertig rote Kappe |
| E (SOLN TMB) | Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citratpuffer mit Wasserstoffperoxid | 15 ml gebrauchsfertig blaue Kappe |
| F (saure Lösung) (0.5N) | Stopplösung 0,5 N saure Lösung | 15 ml gebrauchsfertig gelbe Kappe |
| 0 – 4 (CAL) | Kalibratoren (Verdünntes Serum) Konz.: 1, 10, 30, 100, 300 U/ml | je 1 ml gebrauchsfertig weiße Kappe |
| P (CONTROL) (+) | Kontrolle (Verdünntes Serum) Konz.: siehe Beipackzettel | 1 ml gebrauchsfertig rote Kappe |

4.1 Zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- verstellbare Einkanal-Mikropipette 100 - 1000 µl
- verstellbare Einkanal-Mikropipette 10 - 100 µl
- verstellbare 8-Kanalpipette 50 - 200 µl
- Pipettenspitzen
- Flüssigkeitsreservoir für 8-Kanalpipette
- 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Mikrotiterplatten-Photometer mit optischen Filtern für 450 nm und 620 nm oder 690 nm
- Messzylinder / Bechergläser
- Eppendorfröhrchen 2 ml
- destilliertes oder deionisiertes Wasser

4.2 Menge und Lagerung

Jede Packung ASCA IgG enthält die Reagenzien für 96 Bestimmungen.

Das Verfallsdatum des kompletten Reagenziensatzes ist auf dem Außenetikett des Testbesteckes angegeben. Die Verfallsdaten der Einzelreagenzien können ggf. darüber hinausgehen und sind auf den jeweiligen Reagenzien vermerkt.

Bis zur Verwendung sind alle Reagenzien des ASCA IgG bei 2 - 8 °C zu lagern.

Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2 - 8 °C mindestens 2 Monate haltbar.

4.3 Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Strips ist in einem aluminiumbeschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach dem Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen.

Waschlösungskonzentrat 10fach (1 + 9) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel:

8 ml Waschpufferkonzentrat + 72 ml destilliertes Wasser pro Streifen. Die auf diese Weise verdünnte Waschlösung ist bei 2-8 °C mindestens 30 Tage haltbar.

Beim Waschgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen.

Alle anderen Testkomponenten sind gebrauchsfertig und bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

Substrat lichtgeschützt aufbewahren.

5 TESTDURCHFÜHRUNG

- **Patientenproben 1 + 100 (v/v) vorverdünnen**
z. B. **100 µl Serum + 1,0 ml Probenverdünner (C)**
 - **Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.**
1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (18-25 °C) bringen und alle Reagenzien vor Gebrauch schütteln.
 2. Pipettieren von
100 µl Kalibratoren 1-4, (Kalibrator 0 optional) oder:
100 µl Kalibrator 1 - semi-quantitativ
100 µl positive Kontrolle (P)
100 µl der **1+100** verdünnten Patientenseren
in die vorgesehenen Kavitäten.
 3. Platte abkleben, **60 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren.
 4. Dekantieren und **3 mal** mit **300 µl** Waschlösung (verdünnt aus B) waschen.
 5. **100 µl** Konjugat (D) in jede Kavität pipettieren.
 6. Platte abkleben, **30 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren.
 7. Dekantieren und **3 mal** mit **300 µl** Waschlösung (verdünnt aus B) waschen.
 8. **100 µl** Substrat (E) in jede Kavität pipettieren.
 9. Platte abkleben, **15 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25 °C) **im Dunkeln** inkubieren.
 10. **100 µl** Stopplösung (F) in jede Kavität pipettieren und kurz schütteln.
 11. Messen der OD bei **450 nm** gegen 620 (690) nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

6 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

6.1 Semi-quantitative Auswertung

Die Auswertung der Testergebnisse erfolgt semi-quantitative über die Berechnung des Bindungsindex (BI). Dabei wird der **Quotient** aus der **OD der Patientenprobe** und **OD von Kalibrator 1 (10 U/ml) multipliziert mit dem Faktor 2** gebildet:

$$BI = OD_{\text{Probe}} / (OD_{\text{Kalibrator 1 (10 U/ml)}} \times 2)$$

6.2 Quantitative Auswertung

Die OD-Mittelwerte (MW) der Kalibratoren (CAL 0 optional) 1 - 4 werden auf der Ordinate (lin.) gegen die entsprechenden ASCA IgG-Konzentrationen (Abszisse, log. Maßstab) aufgetragen. Daraus wird eine Standardkurve gezeichnet, aus der sich über die Extinktions-Mittelwerte die jeweiligen ASCA IgG-Konzentrationen der unbekanntesten verdünnten Patientenproben direkt in U/ml ablesen lassen.

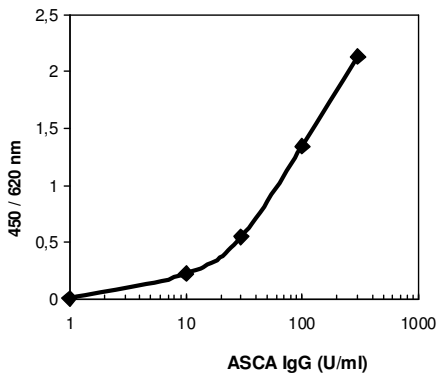
Sofern die oben angegebene Probenverdünnung 1 + 100 angewendet wird, bedarf es keines Multiplikationsfaktors zur Ermittlung der Konzentration der ASCA IgG Antikörper, da die Kalibratoren bereits in dieser Verdünnung vorliegen.

Beide Auswertungen lassen sich auch automatisch über die integrierte Auswerteeinheit des Mikrotiterplatten-Photometers oder durch ein lieferbares Computerprogramm durchführen.

Berechnungsbeispiel (quantitativ)

| Kavität | OD (a) | OD (b) | OD (Mittelwert) | U/ml |
|--------------|--------|--------|-----------------|------|
| Kalibrator 0 | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 1 |
| Kalibrator 1 | 0,217 | 0,223 | 0,220 | 10 |
| Kalibrator 2 | 0,537 | 0,550 | 0,543 | 30 |
| Kalibrator 3 | 1,334 | 1,354 | 1,344 | 100 |
| Kalibrator 4 | 2,100 | 2,162 | 2,131 | 300 |
| Patient 1 | 1,192 | 1,204 | 1,198 | 85 |

Beispiel einer Standardkurve



Bei Proben, deren OD-Werte diejenige des Kalibrators 4 überschreiten, ist die Bestimmung mit einer höheren Proben-Vorverdünnung zu wiederholen.

6.3 Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- OD-Mittelwert des Kalibrators 1 $\leq 0,5$
- OD-Mittelwert des Kalibrators 4 $\geq 1,2$

Sind die o. g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

7 REFERENZWERTE

| ASCA IgG | U/ml | BI |
|----------|-----------|------------|
| Positiv | ≥ 20 | $\geq 1,0$ |
| Negativ | < 20 | $< 1,0$ |

Aufgrund von Unterschieden in der Population wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen pathologischen und normalen Referenzbereiche für ASCA IgG Antikörperspiegel bestimmen sollte. Oben genannte Werte sind deshalb nur als Empfehlung zu werten.

7.1 Grenzen der Methode

Gesunde Individuen sollten mit dem ASCA IgG Testbesteck negativ bestimmt werden. Asymptomatische Probanden können jedoch positive ASCA IgG Antikörperkonzentrationen aufweisen.

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle möglichen klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

8 TESTCHARAKTERISTIKA

8.1 Kalibrierung

Aus Mangel an einer internationalen Referenzpräparation ist der ASCA IgG in arbiträren Einheiten (U/ml) kalibriert.

8.2 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

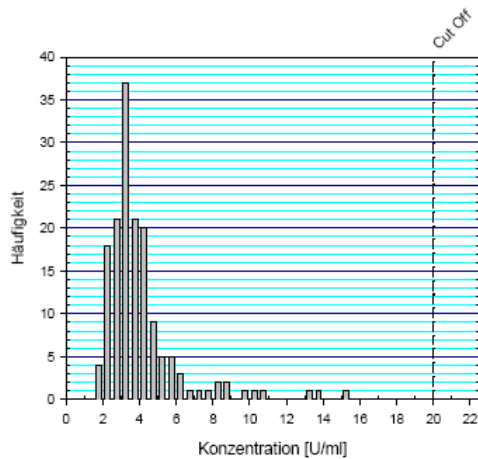
Die Diagnostische Sensitivität und Spezifität von ASCA IgG und IgA (DE4279) wurden durch Testung von 82 Patienten mit Morbus Crohn, 65 Patienten mit Colitis ulcerosa, 101 Patienten mit Zöliakie, 33 Patienten mit PBC, 44 Patienten mit SLE und 250 gesunden Blutspendern ermittelt.

Diagnostische Sensitivität: 50%

Diagnostische Spezifität: 94%

8.3 Normalverteilung

Bei der Untersuchung von 156 unausgewählten Blutspendenserum wurden alle Seren unterhalb des Cut-off von 20 U/ml gefunden, das entspricht einer Spezifität von 100 %.



8.4 Präzision

| Intra-Assay Varianz (n=8) | | Inter-Assay Varianz (n=3x16) | |
|---------------------------|------|------------------------------|------|
| MW (IU/ml) | CV % | MW (IU/ml) | CV % |
| 193 | 2,08 | 196 | 3,62 |
| 134 | 3,74 | 140 | 2,06 |
| 78 | 2,76 | 81 | 1,79 |
| 42 | 1,95 | 43 | 1,59 |
| 23 | 1,11 | 23 | 0,84 |

9 ASSAY - SCHEMA











Verdünnen der Patientenseren 10 µl Serum + 1,0 ml Patientenverdünnungspuffer (C)











| | | | | |
|----|--|--------------|-----------|-----------------|
| 1 | Testreagenzien und Kavitäten auf Raumtemperatur bringen | | | |
| | | Kalibratoren | Kontrolle | Patientenproben |
| 2 | Pipettieren Kalibratoren 0 – 4 oder Kalibrator 1 Kontrolle (P) 1 + 100 vorverdünnte Patientenseren | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| 3 | Inkubieren (Platte abkleben) 60 min bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) | | | |
| 4 | Waschen dekantieren, 3 x 300 µl (verdünnt aus B) | | | |
| 5 | Pipettieren Konjugat (D) | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| 6 | Inkubieren (Platte abkleben) 30 min bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) | | | |
| 7 | Waschen dekantieren, 3 x 300 µl (verdünnt aus B) | | | |
| 8 | Pipettieren Substrat (E) | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| 9 | Inkubieren im Dunkeln 15 min bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) | | | |
| 10 | Pipettieren Stopplösung (F) | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| 11 | Messen 450 nm gegen 620 (690) nm innerhalb von 30 min | | | |

10 ALLGEMEINE HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Dieser Reagenziensatz ist zum in vitro-Gebrauch bestimmt und muss von geschultem Laborpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten.
- Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden.
- Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt.
- Dies gilt auch für die Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller zur Komplettierung eines geöffneten Testbestecks.
- Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen Kathon (1,0 % v/w) als Konservierungsmittel. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.
- Die empfohlene Lagertemperatur angebrochener Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2 - 8 °C.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. AK gegen HIV (Human Immunodeficiency Virus) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten. Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:
 - Nicht essen, trinken oder rauchen!
 - Nie mit dem Mund pipettieren!
 - Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Seren tragen!
 - Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!
- Wir empfehlen, mittels laborinterner Kontrollseren eigene Qualitätskontrollen durchzuführen (s.a. Eichordnung, Bundesgesetzblatt I, S. 1657, 1988 sowie Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen, Dt. Ärzteblatt 98, Heft 42, S. A2747-59, 2001).

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

| Symbol | English | Deutsch | Français | Español | Italiano |
|---|------------------------------------|------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
|  | Consult instructions for use | Gebrauchsanweisung beachten | Consulter les instructions d'utilisation | Consulte las instrucciones de uso | Consultare le istruzioni per l'uso |
|  | European Conformity | CE-Konformitätskennzeichnung | Conformité aux normes européennes | Conformidad europea | Conformità europea |
|  | In vitro diagnostic device | In-vitro-Diagnostikum | Usage Diagnostic in vitro | Para uso Diagnóstico in vitro | Per uso Diagnostica in vitro |
|  | For research use only | Nur für Forschungszwecke | Seulement dans le cadre de recherches | Sólo para uso en investigación | Solo a scopo di ricerca |
|  | Catalogue number | Katalog-Nr. | Numéro de catalogue | Número de catálogo | Numero di Catalogo |
|  | Lot. No. / Batch code | Chargen-Nr. | Numéro de lot | Número de lote | Numero di lotto |
|  | Contains sufficient for <n> tests/ | Ausreichend für "n" Ansätze | Contenu suffisant pour "n" tests | Contenido suficiente para <n> ensayos | Contenuto sufficiente per "n" saggi |
|  | Storage Temperature | Lagerungstemperatur | Température de conservation | Temperatura de conservación | Temperatura di conservazione |
|  | Expiration Date | Mindesthaltbarkeitsdatum | Date limite d'utilisation | Fecha de caducidad | Data di scadenza |
|  | Legal Manufacturer | Hersteller | Fabricant | Fabricante | Fabbricante |
| Distributed by | Distributor | Vertreiber | Distributeur | Distribuidor | Distributore |
| Content | Content | Inhalt | Conditionnement | Contenido | Contenuto |
| Volume/No. | Volume / No. | Volumen/Anzahl | Volume/Quantité | Volumen/Número | Volume/Quantità |

| Symbol | Portugues | Dansk | Svenska | Ελληνικά |
|---|--------------------------------------|--|---|---------------------------------------|
|  | Consulte as instruções de utilização | Se brugsanvisning | Se bruksanvisningen | Εγχειρίδιο χρήστη |
|  | Conformidade com as normas europeias | Europaeisk overensstemmelse | Europeisk överensstämmelse | Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση |
|  | Diagnóstico in vitro | In vitro diagnostik | Diagnostik in vitro | in vitro διαγνωστικό |
|  | | | | |
|  | Catálogo n.º | Katalognummer | Katalog nummer | Αριθμός καταλόγου |
|  | No do lote | Lot nummer | Batch-nummer | Αριθμός Παρτίδος |
|  | | Indeholder tilstrækkeligt til "n" test | Innehåller tillräckligt till "n" tester | Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις |
|  | Temperatura de conservação | Opbevarings-temperatur | Förvaringstemperatur | Θερμοκρασία αποθήκευσης |
|  | Prazo de validade | Udløbsdato | Bäst före datum | Ημερομηνία λήξης |
|  | Fabricante | Producent | Tillverkare | Κατασκευαστής |
| Distributed by | | | | |
| Content | Conteúdo | Indhold | Innehåll | Περιεχόμενο |
| Volume/No. | Volume/Número | Volumen/antal | Volym/antal | Όγκος/αριθ. |