

ASCA-CHEK™

An ELISA for the Detection of Anti-*Saccharomyces cerevisiae*
Antibodies (ASCA) as an aid in the diagnosis of Crohn's Disease
Catalog No. T5016 (96 Tests)

ESPAÑOL p. 11

ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)
como herramienta de ayuda para el diagnóstico de
la enfermedad de Crohn
Prod. No. T5016 (96 Pruebas)

DEUTSCH p. 21

Ein ELISA-Test für den Nachweis von Anti-*Saccharomyces cerevisiae*-Antikör-
pern (ASCA) als Hilfsmittel bei der Diagnose von Morbus Crohn
Katalognummer T5016 (96 Tests)

FRANCAISE p. 31

Dosage immunoenzymatique (ELISA) pour le dépistage des anticorps
Anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) comme outil diagnostique
de la Maladie de Crohn
Numéro de Catalogue T5016 (96 Analyses)

Under U. S. Patent #6,872,540 and European Patent #1444519

Made in the USA

Developed and Manufactured by:



TECHLAB®

2001 Kraft Drive
Blacksburg, VA 24060-6358 USA
www.techlab.com
TEL 1-800-832-4522 USA
TEL 1-540-953-1664 Outside USA



EC REP Emergo Europe
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

ASCA-CHEK™

INTENDED USE

The ASCA-CHEK™ test is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative detection of human anti-*S. cerevisiae* antibodies (ASCA) in feces and serum. The test result is used as an aid in the diagnosis of Crohn's disease in combination with clinical and other laboratory findings. **FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.**

Caution: U.S. Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a physician.

EXPLANATION

An estimated 1 million Americans suffer from inflammatory bowel disease (IBD) that is comprised of Crohn's disease and ulcerative colitis (1). IBD is characterized by a chronic inflammatory response that results in histologic damage to the intestinal lining. Crohn's disease may involve the entire gastrointestinal tract and include inflammation extending into the transmural mucosa, whereas ulcerative colitis only affects the large bowel and includes inflammation of the mucosal lining. These two distinct diseases require a rapid differential diagnosis for optimal treatment. Conventional methods utilizing multiple endoscopy examinations and histological analysis may take years to confirm a diagnosis (2). Test methods for determining the presence of serum ASCA as a marker of Crohn's disease are currently available, with sensitivities ranging from 35 - 70% (3-6).

The ASCA-CHEK™ test is an ELISA for detecting ASCA in human feces and serum. The test provides a method utilizing antigens of *Saccharomyces cerevisiae* for measuring total fecal and serum ASCA as an aid to distinguish Crohn's disease from other gastrointestinal illnesses such as ulcerative colitis and irritable bowel syndrome.

PRINCIPLE OF THE TEST

The ASCA-CHEK™ test detects anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA). The microassay wells supplied with the kit contain immobilized antigens of *Saccharomyces cerevisiae*. The *Conjugate* consists of anti-human immunoglobulin antibody conjugated to horseradish peroxidase. In the assay, an aliquot of either fecal or serum specimen is emulsified in the *Diluent* and the diluted specimen is transferred to the microassay well. If ASCA are present in the specimen, they will bind to the immobilized antigens. After incubation, the wells are washed and the *Conjugate* is added. The *Conjugate* binds to the ASCA captured by the immobilized antigens. A second series of wash steps removes any unbound material. Following the addition of *Substrate*, a color is detected due to the enzyme-antibody-antigen complexes that form in the presence of ASCA.

REAGENTS

DIL 10X **10X Diluent**, 40 mL (10X concentrate of a phosphate buffered protein solution containing 0.2% thimerosal*). The 1X *Diluent* is also to be used as the negative control (see TEST PROCEDURE).

Signal Word: Warning

H373: May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure

H411: Toxic to aquatic life with long lasting effects

P260, P273, P314, P391, P501



CONJ ENZ

Conjugate, 7 mL (goat anti-human polyclonal immunoglobulin-HRP in a buffered solution containing 0.02% thimerosal*)

SUBS REAG

Substrate, 14 mL (tetramethylbenzidine substrate and peroxide)

CONTROL +

Positive Control, 3.5 mL (human ASCA in a buffered protein solution containing 0.02% thimerosal*)

WASHBUF 20X

Wash Buffer Concentrate, 50 mL (20X concentrate containing phosphate-buffered saline, detergent and 0.2% thimerosal*)

Signal Word: Warning

H373: May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure



H411: Toxic to aquatic life with long lasting effects

P260, P273, P314, P391, P501



H_2SO_4 0.6N

Stop Solution, 7 mL (0.6 N sulfuric acid). CAUTION: Avoid contact with skin. Flush with water immediately if contact occurs.

Signal Word: Danger

H314: Causes severe skin burns and eye damage

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501



MA PLT

Microassay Plate, 12 strips, 8 wells per strip, coated with antigens of *Saccharomyces cerevisiae* (stored with desiccant)

*contains mercury



Materials provided

2 Plastic adhesive sheets

100 Flared Transfer pipettes (flared section = 50 μL)

Materials and equipment required but not provided

Squirt bottle for 1X Wash Solution

Vortex mixer

Tubes for dilution of specimen

Discard container/absorbent paper

Refrigerator for storage

Deionized or distilled water

Bottle for 1X Diluent

37°C incubator

ELISA reader capable of reading 450 nm or 450/620 nm

PRECAUTIONS

1. Rx Only - Prescription Only
2. For professional use only.
3. Reagents from different kits should not be mixed. Do not use the kit past the expiration date.
4. Do not freeze the reagents. Store the kit between 2° and 8°C.
5. Reagents should be at room temperature before use.
6. Gently mix all reagents before use.
7. Caps and tips are color coded; do not mix!
8. When handling the microassay wells, avoid scratching the bottom of the wells because this may result in elevated absorbance readings.
9. Hold dropper bottles vertically when dispensing reagent to ensure proper drop size.
10. Unused microassay wells must be placed inside the resealable pouch immediately with the desiccant to protect them from moisture.
11. Perform the washing procedure as directed to avoid high background reactions.
12. Use fecal and serum specimens within 48 hours and 7 days, respectively, of collection to obtain optimal results. Even though a single freeze-thaw is acceptable, frozen specimens (-20°C or lower) may lose activity due to multiple freezing and thawing.
13. The *Substrate* is light sensitive and should be protected from direct sunlight or UV sources. If the *Substrate* is exposed to light and develops a color, it must be discarded.
14. Microbial contamination of reagents may decrease the accuracy of the assay. Avoid microbial contamination of reagents by using sterile disposable pipettes if removing aliquots from reagent bottles.
15. Optimal results are obtained by following the specified test procedure. The concentrations, incubation conditions, and processing specifications have been optimized for sensitivity and specificity. Alterations of the specified procedure and/or test conditions may affect the sensitivity and specificity of the test.
16. The *Positive Control* contains ASCA that is a human derived material. Material has been tested and found negative for antibody to HIV-1, HIV-2, HCV, and HbsAg. No known test method can offer complete assurance that infectious agents are absent. ALL HUMAN SOURCE PRODUCTS SHOULD BE HANDLED AS POTENTIALLY INFECTIOUS MATERIAL. A procedure for handling biohazards is published in the CDC/NIH Manual of Biosafety in Microbiology & Biomedical Laboratories.
17. Handle specimens and used microassay wells as if capable of transmitting infectious agents. Wear disposable gloves when doing the test.
18. The 10X Diluent and the 20X Wash Buffer Concentrate contain 0.2% thimerosal as a

preservative. Once diluted to normal use concentration these solutions are classified as non-hazardous. The *Stop Solution* contains 0.6 N sulfuric acid. Flush with water immediately if contact occurs. Take off contaminated clothing and wash it before reuse. Handle reagents according to existing regulations for laboratory safety and good laboratory practice. Safety Data Sheets for this product are available upon request, contact technical support.

19. Follow your national, regional, and local ordinances accordingly for waste disposal regulations. Do not place in trash, dispose of as hazardous waste.

PRELIMINARY PREPARATIONS

1. All reagents must be at room temperature prior to use in the assay.
2. **Prepare 1X Wash Solution.** The *Wash Solution* is supplied as a 20X concentrate (a precipitate may be noticed and is acceptable). Dilute to a total volume of 1 liter by adding 50 mL of the concentrate to 950 mL of deionized water. Label the bottle. Store any unused 1X *Wash Solution* between 2° and 8°C.
3. **Prepare 1X Diluent.** The *Diluent* is supplied as a 10X concentrate (a precipitate may be noticed and is acceptable). Dilute to a total volume of 400 mL by adding 40 mL of the concentrate to 360 mL of deionized water. Label the bottle. Store any unused 1X *Diluent* between 2° and 8°C.
4. **Microassay Plate preparation.** Each strip contains 8 microassay wells coated with antigens of *Saccharomyces cerevisiae*. Each specimen or control will require one of these coated wells. Avoid contact with the bottom of the wells because this is the optical window for ELISA readers. Microassay wells not used must be immediately returned to the plastic bag and carefully resealed with desiccant.
5. All reagents, with the exception of the *Wash Buffer Concentrate* and the *10X Diluent*, are supplied in ready-to-use bottles. Reagents can be dispensed directly from the dropper bottles or decanted for use with multichannel pipettes. If excess reagent has been decanted, the excess should be discarded. Do not pour back into the bottle. The *Substrate* should be stored in and used from the light protected bottle in which it is supplied. If an aliquot is removed from the original bottle for any reason, do not return unused *Substrate* to the original bottle.

COLLECTION OF **FECAL** SPECIMENS AND PREPARATION OF DILUTIONS

NOTE: Standard collection and handling procedures used in-house for fecal specimens for culture are appropriate. Do not use specimens that have been collected or stored in 10% Formalin, Merthiolate Formalin, Sodium Acetate Formalin, or Polyvinyl Alcohol. Store specimens at -20°C, or lower, if the test cannot be performed within 48 hours of collection. Thaw specimens at room temperature and mix well prior to sample preparation. Store diluted specimens between 2° and 8°C up to 48 hours. Whenever possible, test fecal specimens that are less than 48 hours old. **Mix (vortex) specimens thoroughly prior to performing the assay.** This includes complete mixing of the specimen prior to transfer to 1X *Diluent* as well as complete mixing of the diluted specimen prior to performing the assay.

1. **Prepare Diluted Specimens:**

For Liquid Fecal Specimens: Set up a plastic tube for each specimen to be tested. For each specimen, add 450 µL of 1X *Diluent* to each tube. Use a transfer pipette to add 50 µL (flared section) of liquid fecal specimen to the tube containing 1X *Diluent* for a 1:10 dilution and mix well using a vortex mixer.

For Formed/Solid Fecal Specimens: Set up a plastic tube for each specimen to be tested. For each specimen, add 450 µL of 1X *Diluent* to each tube. Add 0.05 g (flared section) or weigh 0.05 g of solid fecal specimen to the tube containing 1X *Diluent* for a 1:10 dilution and mix well using a vortex mixer.

2. Vortex the tubes for 10 seconds and store between 2° and 8°C until the test is performed. Vortex again before transferring diluted specimen to the microassay well. This ensures thorough mixing of the specimen.

COLLECTION OF SERUM SPECIMENS AND PREPARATION OF DILUTIONS

NOTE: Blood samples should be collected by venipuncture and allowed to clot naturally. Serum should be separated from the clot. Store undiluted specimens at -20°C , or lower, if the test cannot be performed within 7 days of collection. Thaw specimens at room temperature and mix well prior to sample preparation. Diluted specimens may be stored between 2° and 8°C for up to 7 days. Whenever possible, test serum specimens that are less than 7 days old. **Mix (vortex) specimens thoroughly prior to performing the assay.** This includes complete mixing of the specimen prior to transfer to 1X *Diluent* as well as complete mixing of the diluted specimen prior to performing the assay.

1. Prepare Diluted Specimens:

For Serum Specimens: Set up and label 3 plastic tubes for each serum specimen to be tested. For each specimen, add 450 μL of 1X *Diluent* to each of the 3 tubes. Use a transfer pipette to add 50 μL (flared section) of serum specimen to the first tube containing 1X *Diluent* for a 1:10 dilution and mix well using a vortex mixer.

2. Next, transfer 50 μL (flared section) from the 1:10 dilution into the second tube containing *Diluent* for a 1:100 dilution and mix well using a vortex mixer.

3. Next, transfer 50 μL from the tube containing the 1:100 dilution into the third tube containing *Diluent* for a 1:1000 dilution and mix well using a vortex mixer. Vortex the tubes for 10 seconds and store between 2° and 8°C until the test is performed. Vortex again before transferring diluted specimen to the microassay well. This ensures thorough mixing of the specimen.

TEST PROCEDURE

1. Determine the number of wells to be used. Add 1 drop of *Positive Control* (black cap) to a positive control well. Add 50 μL (flared section) of 1X *Diluent* to a negative control well. Add 100 μL (first mark past flared section) of diluted specimen to one well.

Transfer Pipette: Bulb 300 μL 200 μL 100 μL 50 μL Flared tip



2. Incubate the wells at $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes.
3. Shake out the contents of the microassay wells into a discard pan.
4. Wash each well using the 1X *Wash Solution* in a squirt bottle with a fine-tipped nozzle, directing the 1X *Wash Solution* to the bottom of the well with force. Fill the wells (approximately 400 μL when filled), then shake the 1X *Wash Solution* out of the well into a discard pan. Slap the inverted plate on a dry paper towel and repeat wash steps **four times** using a dry paper towel each time. If any particulate matter is seen in the wells, continue washing until all the matter is removed.
5. Add 1 drop of *Conjugate* (red cap) to each well. Incubate the wells at $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes.
6. Repeat Steps #3 and #4. Dispose of all paper towels and specimen containers properly.
7. Add 2 drops of *Substrate* (blue cap) to each well. Gently tap the wells to mix the contents. Incubate the wells at room temperature for 15 minutes. Gently tap the wells 1 or 2 times during the incubation period.
8. Add 1 drop of *Stop Solution* (yellow cap) to each well. Gently tap the wells and wait 2 minutes before reading. The addition of *Stop Solution* converts the blue color to a yellow color, which is detected by measuring the optical density at 450 nm on an ELISA reader. Wipe the underside of each well to remove moisture before measuring the optical density. If a dual reader is used, read at 450 nm and reference 620 nm. Read within two to ten minutes after adding *Stop Solution*.
9. Record absorbance values for the positive control, negative control, and each specimen tested.

QUALITY CONTROL

The positive and negative control must meet the following criteria or the test is invalid. The positive control well must be a visible yellow color. When read on a spectrophotometer, it must have an OD₄₅₀ and OD_{450/620} >0.500. The negative control must have an OD₄₅₀ <0.110 or an OD_{450/620} <0.080. To ensure that carryover did not occur, repeat testing if a sample gives a weak positive result (i.e., <0.400) and is adjacent to a strong positive well.

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

Measurements should be determined at 450 nm on a single wavelength spectrophotometer or at 450/620 nm on a dual wavelength spectrophotometer.

	Spectrophotometric Reading	
	Single Wavelength at 450 nm	Dual Wavelength at 450/620 nm
Negative for fecal specimens	OD < 0.150	<0.110
Positive for fecal specimens	OD ≥ 0.150	≥0.110
Negative for serum specimens	OD < 0.110	<0.080
Positive for serum specimens	OD ≥ 0.110	≥0.080

A positive test result indicates the specimen contains ASCA.

A negative test result indicates the specimen does not contain detectable levels of ASCA.

EXPECTED VALUES

The prevalence of Crohn's disease is estimated from 10 to 198 people/100,000 and appears to be increasing. Crohn's disease is most common in northern Europe and North American populations (9). It affects men and women approximately equally.

In 2 separate groups of healthy subjects, a total of 98% (57/58) and 96% (90/94) tested negative for fecal and serum ASCA, respectively. There were 2 specimen panels consisting of feces (211) and serum (186) collected from non-Crohn's disease patients and healthy subjects from Virginia, Indiana, Minnesota, Massachusetts, and Germany that were tested with the ASCA-CHEK™ test. The age of the population ranged from 1 to 79 years old. For the 5 regional populations, the specificity for fecal specimens was 90% with a 95% Confidence Interval of 85 – 94%. For the 5 regional populations, the specificity for serum specimens was 93% with a 95% Confidence Interval of 88 – 96%.

SHELF-LIFE AND STORAGE

The expiration date of the kit is given on the outside label. Expiration dates for each component are listed on the individual labels. The kit containing the reagents with designated shelf life should be stored between 2° and 8°C and should be returned to the refrigerator as soon as possible after use.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In the clinical evaluation of the ASCA-CHEK™ test using fecal specimens, there were 250 patients with IBD, 45 IBS/non-Crohn's disease patients and 58 healthy control persons enrolled at 5 separate study sites (4 clinical sites and 1 in-house site). In the IBD group, there were 142 patients with Crohn's disease and 108 with ulcerative colitis. The male to female ratio was approximately 1:1 and a total of 40% of patients was less than 18 years old. Fecal consistency ranged from solid to liquid and all specimens showed acceptable reactivity in the assay. A total of 57% of the patients with Crohn's disease were positive by the ASCA-CHEK™ test. The combined analysis for all 5 sites showed a sensitivity and specificity of 57% and 91%, respectively, with an overall correlation of 77% to clinically confirmed Crohn's disease. Table 1 shows the test results for the combined analysis of all 4 study sites and the single in-house site.

Table 1. ASCA-CHEK™ test results of 4 clinical study sites and 1 in-house site for distinguishing Crohn's disease from non-Crohn's disease using feces.

Feces N = 353	Crohn's disease	Ulcerative colitis, IBS and Non-IBD
ASCA-CHEK™ test Positive	81	20
ASCA-CHEK™ test Negative	61	191

		95% Confidence Intervals
Sensitivity	57%	49 - 65%
Specificity	91%	86 - 94%
Correlation	77%	73 - 81%

In a separate clinical evaluation of the ASCA-CHEK™ test using serum specimens, there were 218 patients with IBD, 39 IBS/non-Crohn's disease patients and 94 healthy control persons enrolled at 5 separate study sites (4 clinical sites and 1 in-house site). In the IBD group, there were 172 patients with Crohn's disease and 46 with ulcerative colitis. The male to female ratio was approximately 1:1 and a total of 40% of patients was less than 19 years old. A total of 62% of the patients with Crohn's disease was positive by the ASCA-CHEK™ test. The combined analysis for all 5 sites showed a sensitivity and specificity of 62% and 93%, respectively with an overall correlation of 78% to clinically confirmed Crohn's disease. Tables 2 and 3 show results with the ASCA-CHEK™ test and a commercial ASCA test compared to clinical assessments.

Table 2. ASCA-CHEK™ test results of 4 clinical study sites and 1 in-house site for distinguishing Crohn's disease from non-Crohn's disease using serum.

Serum N = 351	Crohn's disease	Ulcerative colitis, IBS and Non-IBD
ASCA-CHEK™ test Positive	107	13
ASCA-CHEK™ test Negative	65	166

		95% Confidence Intervals
Sensitivity	62%	55 - 69%
Specificity	93%	88 - 96%
Correlation	78%	73 - 82%

Table 3. Commercial ASCA test results of 4 clinical study sites and 1 in-house site for distinguishing Crohn's disease from non-Crohn's disease using serum.

Serum N = 274	Crohn's disease	Ulcerative colitis, IBS and Non-IBD
Commercial ASCA test Positive	89	7
Commercial ASCA test Negative	51	127

		95% Confidence Intervals
Sensitivity	64%	55 - 71%
Specificity	95%	89 - 98%
Correlation	79%	74 - 83%

In a comparative study between serum ASCA and fecal ASCA, a total of 82 IBD patients (45% adult and 55% pediatric) were enrolled and paired fecal and serum specimens were collected from each enrolled subject. The serum specimens were tested on a commercial serum ASCA IgG EIA and the fecal specimens were analyzed by the ASCA-CHEK™ test. There were a total of 5 fecal ASCA-positive specimens that were serum ASCA IgG-negative of which 4 were from patients with Crohn's disease. The comparative statistical analysis between the two assays showed a percent positive agreement of 70% and a percent negative agreement of 88% with an overall agreement of 79%. Table 4 shows the individual test results for the serum and fecal specimen comparative study.

Table 4. Comparative study done between the ASCA-CHEK™ test and a commercial serum ASCA IgG ELISA using paired fecal and serum specimens, respectively.

N = 82	Commercial Serum ASCA IgG ELISA Positive	Commercial Serum ASCA IgG ELISA Negative
Fecal ASCA-CHEK™ test Positive	28	5
Fecal ASCA-CHEK™ test Negative	12	37

		95% Confidence Intervals
Percent Positive Agreement	70%	53 - 83%
Percent Negative Agreement	88%	74 - 96%
Overall Percent Agreement	79%	70 - 86%

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. Fecal samples from the following patients should be excluded from use in the ASCA-CHEK™ test: patients with a history of HIV and/or Hepatitis B and C, patients with a history of infectious diarrhea (within 6 months), and patients having had a colostomy and/or ileostomy within 1 month.
2. The dilutions recommended for fecal and serum specimens in the Package Insert have been evaluated in clinical trials and have been found to be optimal for test results. Therefore, only the dilutions recommended in the Package Insert should be used.
3. Only fecal and serum specimens have been clinically evaluated using the ASCA-CHEK™ test.
4. Fecal specimens that have been preserved in 10% Formalin, Merthiolate Formalin, Sodium Acetate Formalin, Polyvinyl Alcohol or contain barium enema cannot be used. Serum specimens with microbial contamination or that have been heat treated should not be tested.
5. A positive ASCA-CHEK™ test indicates the presence of antibody to *S. cerevisiae* and without consideration of a patient's clinical history or physical examination does not necessarily indicate the presence of Crohn's disease.
6. Samples from patients with chronic liver disease and hypergammaglobulinemia were not evaluated by the ASCA-CHEK™ test for potential presence of fecal ASCA.
7. It is possible that the fecal and serum ASCA results may not agree.

CROSS-REACTIVITY FOR FECAL SPECIMENS

Various intestinal organisms were examined for cross-reactivity in the ASCA-CHEK™ test. For the analysis, media cultures were spiked into a ASCA-negative fecal specimen and tested in the ASCA-CHEK™ according to the Package Insert. None of the organisms below reacted in the ASCA-CHEK™ are listed in this Package Insert. The ASCA-CHEK™ test was not evaluated for potential cross-reactivity with enteric viruses.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Escherichia coli</i> ETEC E2348169
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non-toxigenic) VPI 11186	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Clostridium difficile</i> (toxigenic) VPI 10463	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Clostridium difficile</i> (ToxA-/ToxB+) 8864	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Clostridium perfringens</i> Type A	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Escherichia coli</i> EIEC SD67	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>

INTERFERING SUBSTANCES FOR SERUM

Potential interfering substances present in serum were tested in the ASCA-CHEK™ test. Each substance was tested for potential interference with ASCA-positive and ASCA-negative serum specimens. No interference was observed in the serum specimens tested. Table 5 shows the concentrations and methods of measurement for each substance tested.

Table 5. Interfering substances tested in the ASCA-CHEK™ test.

Test Substance	Method of analysis	Serum Concentration
Lipase	Hitachi 917	> 20 U/L
Cholesterol	Olympus AU5000	504 mg/dL
Hemolyzed blood	Visual red color	Hemolyzed
Rheumatoid Factor (RF)	Nephelometry	27.9 IU/mL
Antinuclear Antibodies (ANA)	Nephelometry	0.263 (ratio)
Bilirubin F (free)	Beckman LX20	19 mg/dL
Bilirubin C (conjugated)	Beckman LX20	18 mg/dL

INCIDENCE OF SERUM ASCA IN NON-CROHN'S DISEASE GROUPS

Sera from non-Crohn's disease groups were tested in the ASCA-CHEK™ test and showed a positivity range of 4% to 13%. Table 6 shows the individual disease groups with the corresponding percent positive rate. Serum ASCA may also be detected in patients with other autoimmune disorders (10).

Table 6. Incidence of serum ASCA in Non-Crohn's disease groups.

Non-Crohn's Disease Group	Number Tested	Number Positive	Percent Positive
Ulcerative colitis	46	6	13%
Irritable Bowel Syndrome	30	3	10%
Constipation	1	0	0%
Esophagitis	1	0	0%
<i>H. pylori</i>	1	0	0%
Alcoholic Cirrhosis	20	1	5%
ANA-positive	3	0	0%
Healthy	94	4	4%

REPRODUCIBILITY AND PRECISION

The inter-assay variation for fecal specimens was determined using 8 ASCA-positive and 4 ASCA-negative fecal specimens tested three times over a 6-day period. During the testing period all positive samples remained positive and all negative samples remained negative. The intra-assay variation was determined using 18 fecal specimens, 13 ASCA-positive and 5 ASCA-negative, tested in 8 replicates for each specimen for a single test run. During the testing period all positive samples remained positive and all negative samples remained negative.

The inter-assay variation for serum specimens was determined using 4 ASCA-positive and 4 ASCA-negative serum specimens tested eight times over a 2-day period. During the testing period all positive samples remained positive and all negative samples remained negative. The intra-assay variation for serum was determined using 4 ASCA-positive and 4 ASCA-negative serum specimens, tested in 8 replicates for each specimen for a single test run. During the testing period all positive samples remained positive and all negative samples remained negative.

ASCA-CHEK™ - ESPAÑOL

USO PREVISTO

El test ASCA-CHEK™ es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detección cualitativa de anticuerpos humanos anti-*S. cerevisiae* (ASCA) en heces y suero. El resultado del test se utiliza como ayuda para el diagnóstico de la enfermedad de Crohn junto con los signos clínicos y parámetros analíticos.

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Precaución: La Ley Federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo o bajo prescripción médica.

FUNDAMENTO

Se estima que un millón de estadounidenses padecen enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que comprende la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (1). La EII se caracteriza por una respuesta inflamatoria crónica que causa daños histológicos en la mucosa intestinal. La enfermedad de Crohn puede afectar todo el tracto digestivo y consiste en una inflamación que se extiende hasta la mucosa transparietal, mientras la colitis ulcerosa sólo afecta al colon e incluye la inflamación de la mucosa intestinal. Estas dos enfermedades diferentes requieren un diagnóstico diferencial rápido para un tratamiento óptimo. Pueden transcurrir años hasta que se confirma el diagnóstico con los métodos convencionales, que incluyen múltiples exploraciones endoscópicas y análisis histológicos (2). En la actualidad se dispone de métodos de análisis para determinar la presencia de ASCA en suero como marcador de la enfermedad de Crohn, con sensibilidades que oscilan entre el 35% y el 70% (3-6).

El test ASCA-CHEK™ es un ELISA para la detección de ASCA en heces y suero humano. Este test proporciona un método que utiliza los antígenos del *Saccharomyces cerevisiae* para la determinación de los ASCA totales en heces y suero como ayuda para distinguir la enfermedad de Crohn de otras enfermedades digestivas, como la colitis ulcerosa y el síndrome del colon irritable.

PRINCIPIO DEL TEST

El test ASCA-CHEK™ detecta los anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). Los pocillos de microanálisis suministrados con este kit contienen antígenos inmovilizados de *Saccharomyces cerevisiae*. El *Conjugado* está compuesto por anticuerpos antiinmunoglobulinas humanas conjugadas con peroxidasa de rábano picante. En el análisis, se emulsiona una parte alícuota de una muestra sérica o fecal en el *Diluyente* y la muestra diluida se transfiere al pocillo del microanálisis. Si hay anticuerpos ASCA presentes en la muestra, se unirán a los antígenos inmovilizados. Después de la incubación, los pocillos se lavan y se añade el *Conjugado*. El *Conjugado* se une a los ASCA captados por los antígenos inmovilizados. Una segunda serie de pasos de lavado elimina cualquier material no unido. Tras la adición de un *Substrato*, se detecta un color debido a los complejos enzima-anticuerpo-antígeno que se forman en presencia de ASCA.

REACTIVOS

DIL 10X *Diluyente 10X*, 40 ml (concentrado 10x de una solución de proteína tamponada con fosfato que contiene un 0,2% de timerosal*). El *Diluyente 1x* también se usa como control negativo (véase PROCEDIMIENTO DEL TEST).

Palabra de advertencia: Advertencia

H373: Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas

H411: Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P260, P273, P314, P391, P501



CONJ ENZ

Conjugado, 7 ml (anti-inmunoglobulina policlonal humana-HRP de cabra en una solución tamponada que contiene un 0,02% de timerosal*)

SUBS REAG

Substrato, 14 ml (substrato con tetrametilbenzidina y peróxido).

CONTROL +

Control Positivo, 3,5 ml (ASCA humanos en una solución de proteína tamponada que contiene un 0,02% de timerosal*).

WASHBUF 20X **Tampón de lavado concentrado**, 50 ml (concentrado 20x que contiene suero fisiológico tamponado con fosfato, detergente y 0,2% de timerosal*).

Palabra de advertencia: Advertencia

H373: Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas

H411: Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P260, P273, P314, P391, P501



H₂SO₄ **0.6N**

Solución de Parada, 7 ml (ácido sulfúrico 0,6N) ATENCIÓN: Evite el contacto con la piel. Aclarar inmediatamente con agua si ocurre el contacto.

Palabra de advertencia: Peligro

H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501



MA **PLT**

Placa para microanálisis, 12 tiras, 8 pocillos por cada tira, recubiertos con antígenos de *Saccharomyces cerevisiae* (conservados con desecante)

*contiene mercurio



Materiales suministrados

Dos hojas adhesivas de plástico

100 pipetas anchas (sección ancha = 50 µl)

Materiales y equipamiento necesarios no suministrados

Frasco con rociador para la *Solución de Lavado* 1x

Tubos para la dilución de las muestras

Contenedor desechable/papel absorbente

Frasco para la *Diluyente* 1x

Lector de ELISA con capacidad de lectura de 450 nm o 450/620 nm

Mezclador de tipo vórtex

Nevera para conservación

Agua desionizada o destilada

Incubadora a 37 °C

PRECAUCIONES

1. Rx Only - Solo con receta
2. Exclusivamente para uso profesional.
3. No deben mezclarse los reactivos de kits diferentes. No utilizar los kits después de la fecha de caducidad.
4. No congelar los reactivos. Conservar los kits entre 2° y 8° C.
5. Los reactivos estarán a temperatura ambiente antes de su uso.
6. Mezclar suavemente todos los reactivos antes de su uso.
7. Los tapones y las puntas están codificados por colores y no deben mezclarse.
8. Cuando se manipulen pocillos de microanálisis, evitar el rascado del fondo de los pocillos, ya que esto podría causar lecturas de absorbancia elevadas.
9. Sostener verticalmente los frascos con gotero al dispensar el reactivo para garantizar el adecuado tamaño de la gota.
10. Los pocillos de microanálisis no utilizados deben colocarse inmediatamente en la bolsa resellable junto con el desecante para protegerlos de la humedad.
11. Efectuar el procedimiento de lavado tal como se indica para evitar reacciones de fondo elevadas.
12. Las muestras fecales y séricas deben analizarse en un plazo no superior a 48 horas y 7 días, respectivamente, desde su recogida, para obtener resultados óptimos. Aunque se permite una única congelación-descongelación, las muestras congeladas (-20° C o inferior) pueden perder actividad por múltiples ciclos de congelación y descongelación.
13. El *Substrato* es sensible a la luz y debe protegerse de la luz solar directa o de fuentes de UV. Si el *Substrato* se expone a la luz y aparece color, debe rechazarse.
14. La contaminación microbiológica de los reactivos puede menoscabar la precisión del análisis. Evitar la contaminación microbiológica de los reactivos utilizando pipetas estériles desechables para extraer partes alícuotas de los frascos de reactivos.

15. Se obtienen resultados óptimos siguiendo el procedimiento analítico especificado. Las concentraciones, las condiciones de incubación y las especificaciones de procesamiento están optimizadas para la sensibilidad y la especificidad del test. Las alteraciones del procedimiento especificado y/o de las condiciones del test pueden afectar a su sensibilidad y especificidad.
16. El *Control Positivo* contiene ASCA, un material de origen humano. El material ha sido analizado y es negativo para los anticuerpos frente al VIH-1, VIH-2, VHC y HBsAg. Ningún método conocido de análisis puede garantizar completamente la ausencia de agentes infecciosos. **TODOS LOS PRODUCTOS DE ORIGEN HUMANO DEBEN MANIPULARSE COMO MATERIAL POTENCIALMENTE INFECCIOSO.** En el Manual de Bioseguridad en Microbiología y Laboratorios Biomédicos (*Manual of Biosafety in Microbiology & Biomedical Laboratories*) de los CDC/NIH se publica un procedimiento para la manipulación de los materiales biológicos peligrosos.
17. Manipular las muestras y los pocillos de microanálisis utilizados como potenciales transmisores de agentes infecciosos. Utilizar guantes para realizar el test.
18. El *diluyente 10X* y el *Concentrado de tampón de lavado 20X* contienen timerosal al 0,2% como conservante. Una vez diluidas hasta la concentración de uso normal, estas soluciones se clasifican como no peligrosas. La *Solución de Parada* contiene ácido sulfúrico 0,6 N. Aclarar inmediatamente con agua si se produce el contacto. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Manejar los reactivos de acuerdo con las normas existentes de seguridad de laboratorio y buenas prácticas de laboratorio. Se dispone de fichas de datos de seguridad de este producto bajo pedido, consultar al soporte técnico.
19. Siga las normas nacionales, regionales y locales para consultar los reglamentos de eliminación de residuos. No lo tire a la basura, elimínelo como residuo peligroso.

PREPARACIONES PRELIMINARES

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de su uso en el análisis.
2. **Preparar la Solución de Lavado 1x.** El *Solución de Lavado* se suministra como concentrado 20x (puede apreciarse un precipitado, lo cual es aceptable). Diluir hasta un volumen total de 1 litro añadiendo 50 ml del concentrado a 950 ml de agua desionizada. Etiquetar el frasco. Conservar la *Solución de Lavado 1X* no utilizada entre 2° y 8° C.
3. **Preparar el Diluyente 1x.** El *Diluyente* se suministra como concentrado 10x (puede apreciarse un precipitado, lo cual es aceptable). Diluir hasta un volumen total de 400 ml añadiendo 40 ml del concentrado a 360 ml de agua desionizada. Etiquetar el frasco. Conservar el *Diluyente 1x* no utilizado entre 2° y 8° C.
4. **Preparación de las Placas para Microanálisis.** Cada tira contiene 8 pocillos de microanálisis recubiertos con antígenos de *Saccharomyces cerevisiae*. Se utilizará uno de estos pocillos recubiertos para cada muestra o control. Evitar el contacto con el fondo de los pocillos, ya que es la ventana óptica de los lectores de ELISA. Los pocillos de microanálisis no utilizados deben devolverse inmediatamente a la bolsa de plástico y resellarse con cuidado con desecante.
5. Todos los reactivos, a excepción del *Tampón de Lavado Concentrado* y el *Diluyente 10x*, se suministran en frascos listos para usar. Los reactivos pueden dispensarse directamente de los frascos con gotero o decantarse para su uso con pipetas multicanal. Si se ha decantado una cantidad excesiva de reactivo, deberá desecharse el sobrante. No se reintroducirá en el frasco. El *Substrato* debe conservarse y utilizarse del frasco fotoprotegido en el que se suministra. Si, por cualquier motivo, se retira una parte alícuota del frasco original, no debe reintroducirse el *Substrato* no utilizado en el frasco original.

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS FECALES Y PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

NOTA: Los procedimientos internos estándar de recogida y manipulación de las muestras fecales para el cultivo son adecuados. No utilizar las muestras que se hayan recogido o almacenado en formol al 10%, formol mertiolato, acetato sódico-formol o alcohol polivinílico. Conservar las muestras congeladas a -20° C o a temperatura inferior si el test no puede realizarse en las 48 horas siguientes a la recogida de la muestra. Descongelar las muestras a temperatura ambiente y mezclar bien antes de preparar las muestras.

Conservar las muestras diluidas entre 2° y 8° C hasta 48 horas. Siempre que sea posible, analizar muestras fecales en un plazo inferior a 48 horas desde su recogida. **Mezclar (con vórtex) completamente las muestras antes del análisis. Esto incluye el mezclado completo de la muestra antes de su transferencia al Diluyente 1x, así como el mezclado completo de la muestra diluida antes de realizar el análisis.**

1. **Preparar las muestras diluidas:**

Para muestras fecales líquidas: Asignar un tubo de plástico para cada muestra que se vaya a analizar. Para cada muestra, añadir 450 µl de *Diluyente 1x* a cada tubo. Utilizar una pipeta para añadir 50 µl (sección ancha) de la muestra fecal líquida al tubo que contiene el *Diluyente 1x* para obtener una dilución 1:10 y mezclar bien con un mezclador de tipo vórtex.

Para muestras fecales formes/sólidas: Asignar un tubo de plástico para cada muestra que se vaya a analizar. Para cada muestra, añadir 450 µl de *Diluyente 1x* a cada tubo. Añadir 0,05 g (sección ancha) o pesar 0,05 g de la muestra fecal sólida al tubo que contiene el *Diluyente 1x* para obtener una dilución 1:10 y mezclar bien con un mezclador de tipo vórtex.

2. Mezclar con un vórtex los tubos durante 10 segundos y almacenarlos a una temperatura entre 2° y 8° C hasta que realice el análisis. Volver a mezclar en un vórtex antes de transferir la muestra diluida al pocillo de microanálisis. De esta forma se garantiza que la muestra se mezcla bien.

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS SÉRICAS Y PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

NOTA: Las muestras de sangre deben obtenerse por venopunción y se permitirá su coagulación natural. Se separará el suero del coágulo. Conservar las muestras congeladas a -20° C o a temperatura inferior si el test no puede realizarse en los 7 días siguientes a la recogida de la muestra. Descongelar las muestras a temperatura ambiente y mezclar bien antes de preparar las muestras. Las muestras diluidas pueden conservarse a una temperatura de 2° y 8° C durante un plazo máximo de 7 días. Siempre que sea posible, analizar muestras séricas en un plazo inferior a los 7 días desde su recogida. **Mezclar (con vórtex) completamente las muestras antes del análisis. Esto incluye el mezclado completo de la muestra antes de su transferencia al Diluyente 1x, así como el mezclado completo de la muestra diluida antes de realizar el análisis.**

1. **Preparar las muestras diluidas:**

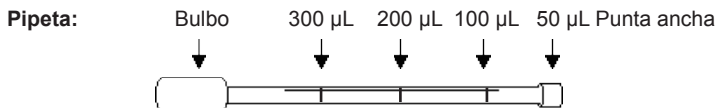
Para muestras séricas: Asignar y etiquetar 3 tubos de plástico para cada muestra de suero que se vaya a analizar. En cada muestra, añadir 450 µl de *Diluyente 1x* a cada uno de los tres tubos. Utilizar una pipeta para añadir 50 µl (sección ancha) de la muestra sérica al primer tubo que contiene el *Diluyente 1x* para obtener una dilución 1:10 y mezclar bien con un mezclador de tipo vórtex.

2. A continuación, transferir 50 µl (sección ancha) de la dilución 1:10 al segundo tubo que contiene el *Diluyente* para obtener una dilución 1:100 y mezclar bien con un mezclador de tipo vórtex.
3. A continuación, transferir 50 µl del tubo que contiene la dilución 1:100 al tercer tubo que contiene el *Diluyente* para obtener una dilución 1:1000 y mezclar bien con un mezclador de tipo vórtex.

Mezclar con un vórtex los tubos durante 10 segundos y almacenarlos a una temperatura entre 2° y 8° C hasta que realice el análisis. Volver a mezclar en un vórtex antes de transferir la muestra diluida al pocillo de microanálisis. De esta forma se garantiza que la muestra se mezcla bien.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

1. Determinar el número de pocillos que se va a utilizar. Añadir 1 gota de *Control Positivo* (tapón negro) al pocillo de control positivo. Añadir 50 µl (sección ancha) del *Diluyente 1x* al pocillo de control negativo. Añadir 100 µl (primera marca después de la sección ancha) de la muestra diluida a un pocillo.



2. Incubar los pocillos a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.
3. Vaciar el contenido de los pocillos de microanálisis a un contenedor de desechos.
4. Lavar cada pocillo con la *Solución de Lavado* 1x en un frasco con rociador con boquilla de punta fina, dirigiendo con fuerza la *Solución de Lavado* 1x al fondo del pocillo. Llenar los pocillos (aproximadamente 400 µl cuando están llenos) y vaciar la *Solución de Lavado* 1x de los pocillos a un contenedor de desechos. Golpear la placa invertida sobre una compresa de papel seca y repetir **cuatro veces** los pasos de lavado, con una compresa de papel seca cada vez. Si se observan partículas en los pocillos, seguir lavando hasta que se elimine esta materia.
5. Añadir 1 gota de *Conjugado* (tapón rojo) a cada pocillo. Incubar los pocillos a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.
6. Repetir los pasos 3 y 4. Eliminar adecuadamente las compresas de papel y los contenedores de muestras.
7. Añadir dos gotas de *Substrato* (tapón azul) a cada pocillo. Percutir suavemente los pocillos para mezclar el contenido. Incubar los pocillos durante 15 minutos a temperatura ambiente. Percutir suavemente los pocillos 1 ó 2 veces durante la incubación.
8. Añadir una gota de *Solución de Parada* (tapón amarillo) a cada pocillo. Percutir suavemente los pocillos y esperar 2 minutos antes de la lectura. La adición de la *Solución de Parada* convierte el color azul en amarillo, lo cual se detecta midiendo la densidad óptica a 450 nm en un lector de ELISA. Antes de determinar la densidad óptica, limpiar la parte inferior de cada pocillo para retirar la humedad. Si se utiliza un lector dual, leer a 450 nm y la referencia a 620 nm. Leer entre 2 y 10 minutos tras añadir la *Solución de Parada*.
9. Registrar los valores de absorbancia del control positivo, el control negativo y de cada muestra analizada.

CONTROL DE CALIDAD

Los controles positivo y negativo deben cumplir los siguientes criterios o el test no es válido. El pocillo del control positivo deberá tener un color amarillo visible. Cuando se lee en un espectrofotómetro, debe tener una OD_{450} y $\text{OD}_{450/620} > 0,500$. El control negativo debe tener una $\text{OD}_{450} < 0,110$ o una $\text{OD}_{450/620} < 0,080$. Para garantizar que no se ha producido ningún efecto de arrastre, debe repetirse el análisis si una muestra da un resultado débilmente positivo (es decir, $< 0,400$) y está adyacente a un pocillo fuertemente positivo.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL TEST

Las mediciones deben determinarse a 450 nm en un espectrofotómetro de onda única o a 450/620 nm en un espectrofotómetro de onda doble.

	Lectura espectrofotométrica	
	Longitud de onda única a 450 nm	Longitud de onda dual a 450/620 nm
Negativo para las muestras fecales	$\text{OD} < 0,150$	$\text{OD} < 0,110$
Positivo para las muestras fecales	$\text{OD} \geq 0,150$	$\text{OD} \geq 0,110$
Negativo para las muestras séricas	$\text{OD} < 0,110$	$\text{OD} < 0,080$
Positivo para las muestras séricas	$\text{OD} \geq 0,110$	$\text{OD} \geq 0,080$

Un resultado positivo del test indica que la muestra contiene ASCA.

Un resultado negativo del test indica que la muestra no contiene concentraciones detectables de ASCA.

VALORES ESPERADOS

Se estima que la prevalencia de la enfermedad de Crohn oscila entre 10 y 198 casos/100.000 personas y se estima que aumenta. La enfermedad de Crohn es más frecuente en la población del norte de Europa y Norteamérica (9). Afecta aproximadamente por igual a varones y mujeres.

En dos grupos diferentes de sujetos sanos, en el 98% (57/58) y el 96% (90/94) del total se obtuvieron resultados negativos para ASCA en muestras fecales y séricas, respectivamente. Se analizaron con el test ASCA-CHEK™ dos paneles de muestras fecales (211) y séricas (186) de pacientes sin enfermedad de Crohn y de sujetos sanos procedentes de Virginia, Indiana, Minnesota, Massachusetts y Alemania. La edad de la población osciló entre 1 y 79 años. Para las 5 poblaciones regionales, la especificidad en las muestras fecales fue del 90% con un intervalo de confianza del 95% del 85-94%. Para las 5 poblaciones regionales, la especificidad en las muestras séricas fue del 93% con un intervalo de confianza del 95% del 88-96%.

PERÍODO DE VALIDEZ Y CONSERVACIÓN

La fecha de caducidad del kit se indica en la etiqueta exterior. Las fechas de caducidad de cada componente se indican en las etiquetas individuales. El kit que contiene los reactivos con el período de validez indicado debe conservarse entre 2° y 8° C y debe reintegrarse al frigorífico tan pronto como sea posible después de su uso.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

En la evaluación clínica del test ASCA-CHEK™ en muestras fecales se incluyó a 250 pacientes con EII, 45 pacientes con EII/sin enfermedad de Crohn y 58 personas sanas de control, procedentes de 5 centros de estudio independientes (4 centros clínicos y 1 centro interno). En el grupo con EII, 142 pacientes presentaban enfermedad de Crohn y 108 colitis ulcerosa. La proporción de varones y mujeres fue aproximadamente de 1:1 y el 40% de los pacientes tenía menos de 18 años. La consistencia de las heces fue de sólida a líquida y la reactividad analítica fue aceptable en todas las muestras. El 57% de los pacientes con enfermedad de Crohn presentó un test ASCA-CHEK™ positivo. El análisis combinado de los 5 centros demostró una sensibilidad y una especificidad del 57% y el 91%, respectivamente, con una correlación global del 77% con la enfermedad de Crohn confirmada clínicamente. En la Tabla 1 se muestran los resultados del test con el análisis combinado de los 4 centros de estudio y el centro interno.

Tabla 1. Resultados del test ASCA-CHEK™ en 4 centros clínicos y 1 centro interno para distinguir la enfermedad de Crohn de otras enfermedades utilizando heces.

Heces N = 353	Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa, SCI y sin EII
Positivos con el test ASCA-CHEK™	81	20
Negativos con el test ASCA-CHEK™	61	191

		Intervalos de confianza del 95%
Sensibilidad	57%	49 - 65%
Especificidad	91%	86 - 94%
Correlación	77%	73 - 81%

En otra evaluación clínica del test ASCA-CHEK™ realizada en muestras séricas se incluyó a 218 pacientes con EII, 39 pacientes con SCI/sin enfermedad de Crohn y 94 personas sanas de control en 5 centros de estudio independientes (4 centros clínicos y 1 centro ambulatorio). En el grupo con EII, 172 pacientes presentaban enfermedad de Crohn y 46 colitis ulcerosa. La proporción de varones y mujeres fue aproximadamente de 1:1 y el 40% de los pacientes tenía menos de 19 años. El 62% de los pacientes con enfermedad de Crohn presentó un test ASCA-CHEK™ positivo. El análisis combinado de los 5 centros demostró una sensibilidad y una especificidad del 62% y el 93%, respectivamente, con una correlación global del 78% con la enfermedad de Crohn confirmada clínicamente. En las Tablas 2 y 3 se muestran los resultados con el test ASCA-CHEK™ y con un test ASCA comercial, comparados con las evaluaciones clínicas.

Tabla 2. Resultados del test ASCA-CHEK™ en 4 centros clínicos y 1 centro interno para distinguir la enfermedad de Crohn de otras enfermedades utilizando suero.

Suero N = 351	Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa, SCI y sin EII
Positivo con el test ASCA-CHEK™	107	13
Negativo con el test ASCA-CHEK™	65	166

		Intervalos de confianza del 95%
Sensibilidad	62%	55 - 69%
Especificidad	93%	88 - 96%
Correlación	78%	73 - 82%

Tabla 3. Resultados del test comercial de ASCA en 4 centros clínicos y 1 centro interno para distinguir la enfermedad de Crohn de otras enfermedades utilizando suero.

Suero N = 274	Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa, SCI y sin EII
Positivos con el test ASCA comercial	89	7
Negativos con el test ASCA comercial	51	127

		Intervalos de confianza del 95%
Sensibilidad	64%	55 - 71%
Especificidad	95%	89 - 98%
Correlación	79%	74 - 83%

En un estudio comparativo sobre los ASCA séricos y fecales en 82 pacientes con EII (adultos, 45%; niños, 55%) se recogieron muestras emparejadas de heces y suero de cada sujeto participante. Las muestras séricas se analizaron con un ensayo de inmunoabsorción enzimático (EIA) comercial de ASCA IgG séricos y las muestras fecales se analizaron con el test ASCA-CHEK™. Cinco muestras fecales positivas para ASCA fueron negativas para los ASCA IgG séricos, 4 de ellas procedían de pacientes con enfermedad de Crohn. El análisis estadístico comparativo entre los dos análisis demostró una concordancia positiva del 70% y una concordancia negativa del 88% con una concordancia global del 79%. En

la tabla 4 se muestran los resultados individuales del test en el estudio comparativo de muestras séricas y fecales.

Tabla 4. Estudio comparativo entre el test ASCA-CHEK™ y un ELISA comercial de ASCA IgG séricos con muestras séricas y fecales emparejadas, respectivamente.

N = 82	ELISA Comercial de ASCA IgG séricos Positivo	ELISA Comercial de ASCA IgG séricos Negativo
Positivos con el test ASCA-CHEK™ en muestras fecales	28	5
Negativos con el test ASCA-CHEK™ en muestras fecales	12	37

		Intervalos de confianza del 95%
Concordancia positiva	70%	53 - 83%
Concordancia negativa	88%	74 - 96%
Concordancia global	79%	70 - 86%

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Se excluirán del uso del test ASCA-CHEK™ las muestras fecales de los siguientes pacientes: pacientes con antecedentes de VIH o hepatitis B y C, pacientes con antecedentes de diarrea infecciosa (en los 6 meses anteriores) y pacientes a los que se les ha practicado una colostomía o una ileostomía durante el mes precedente.
2. Las diluciones de las muestras fecales y séricas recomendadas en el prospecto han sido evaluadas en estudios clínicos y se ha determinado que sus resultados son óptimos. Por tanto, sólo deben utilizarse las diluciones recomendadas en el prospecto.
3. Sólo se han evaluado clínicamente muestras fecales y séricas con el test ASCA-CHEK™.
4. No se pueden utilizar las muestras fecales conservadas en formol al 10%, formol mertiolato, acetato sódico-formol o alcohol polivinílico o que contengan bario procedente de un enema opaco. No se deben evaluar muestras de suero con contaminación microbiológica o que hayan sido tratadas con calor.
5. Un resultado positivo con el test ASCA-CHEK™ indica la presencia del anticuerpo frente al *S. cerevisiae* y, sin tener en cuenta la anamnesis o la exploración física del paciente, no indica necesariamente la presencia de la enfermedad de Crohn.
6. No se evaluaron con el test ASCA-CHEK™ la posible presencia de ASCA fecales en las muestras de los pacientes con hepatopatías crónicas e hipergammaglobulinemia.
7. Es posible que los resultados de ASCA de las muestras fecales y séricas no concuerden.

REACTIVIDAD CRUZADA EN MUESTRAS FECALES

Se ha evaluado la reactividad cruzada de diferentes microorganismos intestinales con el test ASCA-CHEK™. Para el análisis, se inocularon medios de cultivo en una muestra fecal negativa para ASCA y se analizó en el test ASCA-CHEK™ de acuerdo con el prospecto. En este prospecto se citan los microorganismos que no son reactivos en el test ASCA-CHEK™. No se evaluó la posible reactividad cruzada del test ASCA-CHEK™ con virus intestinales.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Escherichia coli</i> ETEC E2348169
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non-toxigenic) VPI 11186	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Clostridium difficile</i> (toxigenic) VPI 10463	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Clostridium difficile</i> (ToxA-/ToxB+) 8864	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Clostridium perfringens</i> Type A	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Escherichia coli</i> EIEC SD67	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>

SUSTANCIAS INTERFERENTES PROCEDENTES DEL SUERO

En el test ASCA-CHEK™ se analizaron sustancias interferentes potenciales presentes en el suero. Se evaluó la posible interferencia de cada sustancia con muestras de suero positivas y negativas para ASCA. No se observó ninguna interferencia en las muestras de suero analizadas. En la Tabla 5 se muestran las concentraciones y los métodos de determinación de cada sustancia evaluada.

Tabla 5. Sustancias interferentes evaluadas en el test ASCA-CHEK™.

Sustancia evaluada	Método de análisis	Concentración sérica
Lipasa	Hitachi 917	> 20 U/l
Colesterol	Olympus AU5000	504 mg/dl
Sangre hemolizada	Color rojo visual	Hemolizada
Factor reumatoide (FR)	Nefelometría	27,9 UI/ml
Anticuerpos antinucleares (AAN)	Nefelometría	0,263 (cociente)
Bilirrubina F (libre)	Beckman LX20	19 mg/dl
Bilirrubina C (conjugada)	Beckman LX20	18 mg/dl

INCIDENCIA DE ASCA SÉRICOS EN GRUPOS SIN ENFERMEDAD DE CROHN

Se analizaron los sueros de grupos sin enfermedad de Crohn con el test ASCA-CHEK™ y se observó un intervalo de positividad comprendido entre el 4% y el 13%. En la Tabla 6 se muestran los grupos de enfermedad con el porcentaje de positividad correspondiente. Los ASCA séricos también pueden detectarse en pacientes con otros trastornos autoinmunitarios (10).

Tabla 6. Incidencia de ASCA séricos en grupos sin enfermedad de Crohn.

Grupo sin enfermedad de Crohn	Número de pacientes evaluados	Número con resultado positivo	Porcentaje de resultados positivos
Colitis ulcerosa	46	6	13%
Síndrome de colon irritable	30	3	10%
Estreñimiento	1	0	0%
Esofagitis	1	0	0%

<i>H. pylori</i>	1	0	0%
Cirrosis alcohólica	20	1	5%
AAN positivos	3	0	0%
Sanos	94	4	4%

REPRODUCIBILIDAD Y PRECISIÓN

Se determinó la variación interanalítica de las muestras fecales con 8 muestras fecales positivas para ASCA y 4 negativas para ASCA, analizadas tres veces, durante un período de 6 días. Durante el periodo de análisis todas las muestras positivas continuaron siendo positivas y todas las muestras negativas continuaron siendo negativas. La variación intraanalítica se determinó utilizando 18 muestras fecales, 13 positivas para ASCA y 5 negativas para ASCA, analizadas en 8 repeticiones para cada muestra durante una única serie analítica. Durante el periodo de análisis todas las muestras positivas continuaron siendo positivas y todas las muestras negativas continuaron siendo negativas.

Se determinó la variación interanalítica de las muestras séricas con 4 muestras séricas positivas para ASCA y 4 negativas para ASCA, analizadas ocho veces, durante un período de 2 días. Durante el periodo de análisis todas las muestras positivas continuaron siendo positivas y todas las muestras negativas continuaron siendo negativas. La variación intraanalítica de las muestras séricas se determinó utilizando 4 muestras séricas positivas para ASCA y 4 negativas para ASCA, analizadas en 8 repeticiones para cada muestra durante una única serie analítica. Durante el periodo de análisis todas las muestras positivas continuaron siendo positivas y todas las muestras negativas continuaron siendo negativas.

VERWENDUNGSZWECK

Der ASCA-CHEK™-Test ist ein Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (ELISA) für den qualitativen Nachweis von menschlichen Anti-*S. cerevisiae*-Antikörpern (ASCA) im Stuhl und Serum. Das Testergebnis dient in Kombination mit klinischen und anderen Laborergebnissen als Hilfsmittel bei der Diagnose von Morbus Crohn.

IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM.

Achtung: Gemäß US-Bundesgesetz ist der Verkauf dieses Produkts an Ärzte bzw. auf Anordnung eines Arztes beschränkt.

ERKLÄRUNG

Etwa 1 Million Menschen in den USA leiden an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED), die sich entweder als Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa manifestiert (1). Die CED zeichnet sich durch eine chronisch entzündliche Reaktion aus, die zur histologischen Schädigung der Darmschleimhaut führt. Während Morbus Crohn den gesamten Verdauungstrakt erfassen und die Entzündung transmural die Schleimhaut durchziehen kann, ist bei Colitis ulcerosa nur der Dickdarm betroffen und lediglich die Schleimhautoberfläche entzündet. Für eine optimale Behandlung ist eine rasche Differenzialdiagnose dieser beiden unterschiedlichen Erkrankungen erforderlich. Bei herkömmlichen Methoden, die auf mehrere endoskopische Untersuchungen und eine histologische Analyse zurückgreifen, kann es Jahre bis zur Bestätigung einer Diagnose dauern. (2). Zurzeit sind Testmethoden erhältlich, bei denen das Vorhandensein von ASCA im Serum als Marker für Morbus Crohn mit einer Sensitivität zwischen 35 und 70% bestimmt wird (3-6).

Der ASCA-CHEK™-Test ist ein ELISA für den Nachweis von ASCA in menschlichem Stuhl und Serum. Bei diesem Test wird über die Antigene aus *Saccharomyces cerevisiae* der Gesamtgehalt von ASCA im Stuhl und Serum gemessen, was als Hilfsmittel bei der Unterscheidung von Morbus Crohn und anderen Magen-Darm-Erkrankungen wie Colitis ulcerosa und Reizdarmsyndrom dient.

TESTPRINZIP

Der ASCA-CHEK™-Test weist Anti-*Saccharomyces cerevisiae*-Antikörper (ASCA) nach. Die mit dem Kit mitgelieferten Mikrotiterkavitäten enthalten immobilisierte Antigene von *Saccharomyces cerevisiae*. Das *Konjugat* besteht aus Anti-Human-Immunglobulin-Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Bei dem Test wird ein Aliquot einer Stuhl- oder Serumprobe im *Verdünnungspuffer* emulgiert und die verdünnte Probe in die Mikrotiterplattenkavität übertragen. Wenn ASCA in der Probe vorhanden sind, binden sie an die immobilisierten Antigene. Nach der Inkubation werden die Kavitäten gewaschen und das *Konjugat* hinzugefügt. Das *Konjugat* bindet an die durch die immobilisierten Antigene eingefangenen ASCA. Nicht gebundenes Material wird durch eine zweite Serie von Waschschritten entfernt. Nach der Zugabe von *Substrat* wird aufgrund der Enzym-Antikörper-Antigen-Komplexe, die sich in Gegenwart von ASCA bilden, eine Färbung nachgewiesen.

REAGENZIEN

DIL 10X **10x-Verdünnungspuffer**, 40 ml (10x-Konzentrat einer phosphatgepufferten Proteinlösung mit 0,2% Thimerosal*). Der 1x-*Verdünnungspuffer* wird auch als negative Kontrolle verwendet (siehe TESTVERFAHREN).

Signalwort: Warnung

H373: Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition

H411: Giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

P260, P273, P314, P391, P501

CONJ ENZ

Konjugat, 7 ml (polyklonales Anti-Human-Immunglobulin von der Ziege, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, in einer gepufferten Lösung mit 0,02% Thimerosal*)



SUBS	REAG
CONTROL	+

Substrat, 14 ml (Lösung aus Tetramethylbenzidin-Substrat und Peroxid).

Positive Kontrolle, 3,5 ml (menschliche ASCA in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal*).

WASHBUF	20X
---------	-----

Waschpuffer-Konzentrat, 50 ml (20x-Konzentrat mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung, Detergenz und 0,2% Thimerosal*).

Signalwort: Warnung

H373: Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition

H411: Giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

P260, P273, P314, P391, P501



H ₂ SO ₄	0.6N
--------------------------------	------

Stopplösung, 7 ml (0,6 N Schwefelsäure). VORSICHT: Kontakt mit der Haut vermeiden. Bei Kontakt sofort mit Wasser abspülen.

Signalwort: Gefahr

H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361,

P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501



MA	PLT
----	-----

Mikrotiterplatte, 12 Streifen, 8 Kavitäten pro Streifen, beschichtet mit Antigenen von *Saccharomyces cerevisiae* (mit Trockenmittel gelagert).

*enthält Quecksilber (Hg)



Packungsinhalt

2 Kunststoff-Klebebögen

100 Transferpipetten (konisch erweiterter Bereich = 50 µl)

Benötigte, aber nicht enthaltene Materialien

Spritzflasche für 1x-*Waschlösung*

Reagenzröhrchen zur Probenverdünnung

Kühlschrank für die Lagerung

Flasche für 1x-*Verdünnungspuffer*

ELISA-Lesegerät für eine Wellenlänge von 450 nm oder 450/620 nm

Vortex-Schüttler

Abfallbehälter/Saugpapier

Entionisiertes oder destilliertes Wasser

37°C-Inkubator

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Rx Only - Verschreibungspflichtig
2. Nur für den professionellen Gebrauch.
3. Reagenzien aus verschiedenen Kits nicht mischen. Verwenden Sie das Kit nicht nach dem Verfallsdatum.
4. Reagenzien nicht einfrieren. Lagern Sie das Kit zwischen 2 °C und 8 °C.
5. Die Reagenzien müssen vor dem Gebrauch Raumtemperatur annehmen.
6. Alle Reagenzien vor Gebrauch vorsichtig mischen.
7. Verschlüsse und Spitzen sind farbkodiert; nicht vertauschen!
8. Achten Sie bei der Handhabung der Kavitäten darauf, diese nicht zu verkratzen, da dies zu erhöhten Absorptionsmesswerten führen kann.
9. Halten Sie die Tropfflaschen beim Dispensieren von Reagenz senkrecht, um die richtige Tropfengröße sicherzustellen.
10. Nicht verwendete Mikrotiterkavitäten müssen sofort mit Trockenmittel zurück in den wiederverschließbaren Beutel gegeben werden, damit sie vor Feuchtigkeit geschützt sind.
11. Führen Sie das Waschverfahren nach Anweisung durch, um starke Hintergrundreaktionen zu vermeiden.
12. Verwenden Sie Stuhl- und Serumproben innerhalb von 48 Stunden bzw. 7 Tagen nach der Entnahme, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Einmaliges Einfrieren und Auftauen ist erlaubt, bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen können gefrorene Proben (-20 °C oder niedriger) jedoch an Aktivität verlieren.
13. Das *Substrat* ist lichtempfindlich und muss vor direktem Sonnenlicht und UV-Quellen

geschützt werden. Wenn das *Substrat* Licht ausgesetzt wird und eine Färbung entwickelt, muss es entsorgt werden.

14. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien kann die Genauigkeit des Tests beeinträchtigen. Vermeiden Sie mikrobielle Kontaminationen der Reagenzien durch Verwendung steriler Einweg-Pipetten für die Reagenzienentnahme aus den Flaschen
15. Optimale Ergebnisse werden erzielt, wenn das angegebene Testverfahren befolgt wird. Die Konzentrationen, Inkubationsbedingungen und Verfahrensdetails wurden in Bezug auf Sensitivität und Spezifität optimiert. Abweichungen vom angegebenen Verfahren und/oder Änderungen der Testbedingungen können die Sensitivität und Spezifität des Tests beeinflussen.
16. Die *positive Kontrolle* enthält ASCA menschlicher Herkunft. Das Material wurde getestet und als negativ auf Antikörper gegen HIV-1, HIV-2, HCV und HbsAg befunden. Das Vorhandensein von Infektionsträgern kann jedoch mit keiner bekannten Testmethode vollständig ausgeschlossen werden. ALLE PRODUKTE MENSCHLICHER HERKUNFT SIND ALS POTENZIELL INFEKTIÖS ZU BEHANDELN. Im CDC/NIH-Handbuch für Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Labors ist die Verfahrensweise für den Umgang mit biologischen Gefahrstoffen veröffentlicht.
17. Behandeln Sie die Proben und gebrauchten Kavitäten als infektiöses Material. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Handschuhe.
18. Der 10-fache *Verdünnungspuffer* und das 20-fache *Waschpufferkonzentrat* enthalten 0,2 % Thimerosal als Konservierungsmittel. Sobald sie auf normale Gebrauchskonzentration verdünnt sind, werden diese Lösungen als ungefährlich eingestuft. Die *Stopplösung* enthält 0,6 N Schwefelsäure. Bei Kontakt sofort mit Wasser abspülen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Reagenzien gemäß vorhandenen Vorschriften für die Laborsicherheit und gute Laborpraxis behandeln. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Nachfrage erhältlich. Wenden Sie sich an den technischen Support.
19. Befolgen Sie Ihre nationalen, regionalen und lokalen Verordnungen in Bezug auf die Abfallentsorgung. Nicht zum Hausmüll geben, als gefährlichen Abfall entsorgen.

VORBEREITUNGEN

1. Vor der Testverwendung müssen alle Reagenzien Raumtemperatur angenommen haben.
2. **Bereiten Sie die 1X-Waschlösung zu.** Die *Waschlösung* wird als 20x-Konzentrat geliefert (möglicherweise ist ein Präzipitat sichtbar, was akzeptabel ist). Verdünnen Sie auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter, indem Sie 50 ml Konzentrat zu 950 ml entionisiertem Wasser hinzufügen. Beschriften Sie die Flasche. Lagern Sie nicht gebrauchte 1x-*Waschlösung* zwischen 2 °C und 8 °C.
3. **Bereiten Sie den 1x-Verdünnungspuffer zu.** Der *Verdünnungspuffer* wird als 10x-Konzentrat geliefert (möglicherweise ist ein Präzipitat sichtbar, was akzeptabel ist). Verdünnen Sie auf ein Gesamtvolumen von 400 ml, indem Sie 40 ml Konzentrat zu 360 ml entionisiertem Wasser hinzufügen. Beschriften Sie die Flasche. Lagern Sie nicht gebrauchten 1x-*Verdünnungspuffer* zwischen 2 °C und 8 °C.
4. **Vorbereitung der Mikrotiterplatte.** Jeder Streifen enthält 8 Mikrotiterkavitäten, die mit Antigenen von *Saccharomyces cerevisiae* beschichtet sind. Für jede Probe bzw. Kontrolle ist eine dieser beschichteten Kavitäten erforderlich. Berühren Sie nicht den Boden der Kavitäten, da dieser das optische Fenster für das ELISA-Lesegerät darstellt. Nicht verwendete Mikrotiterkavitäten müssen sofort zurück in den Kunststoffbeutel gegeben und mit Trockenmittel gut verschlossen werden.
5. Mit Ausnahme des *Waschpuffer-Konzentrats* und 10x-*Verdünnungspuffers* werden alle Reagenzien in gebrauchsfertigen Flaschen geliefert. Die Reagenzien können direkt aus den Tropfflaschen verteilt oder für Mehrkanalpipetten dekantiert werden. Wenn überschüssiges Reagenz dekantiert wird, muss der Überschuss entsorgt werden. Nicht zurück in die Flasche gießen. Das *Substrat* muss in der lichtgeschützten Flasche, in der es geliefert wurde, gelagert und direkt aus dieser verwendet werden. Wenn aus der Originalflasche aus irgendeinem Grund ein Aliquot entnommen wurde, darf nicht verwendetes *Substrat* nicht wieder zurück in die Originalflasche gegeben werden.

STUHLPROBENNAHME UND ZUBEREITUNG DER VERDÜNNUNGEN

BITTE BEACHTEN: Die üblichen Labormethoden für die Entnahme und Handhabung von Stuhlproben für Kulturen sind geeignet. Verwenden Sie keine Proben, die in 10% Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol gesammelt oder gelagert wurden. Lagern Sie die Proben bei -20 °C oder darunter, wenn der Test nicht innerhalb von 48 Stunden nach der Entnahme durchgeführt werden kann. Lassen Sie die Proben bei Raumtemperatur auftauen, und mischen Sie sie vor der Vorbereitung für den Test gut durch. Lagern Sie verdünnte Proben zwischen 2 °C und 8 °C bis zu 48 Stunden. Testen Sie nach Möglichkeit nur Stuhlproben, die weniger als 48 Stunden alt sind. **Mischen (vortexen) Sie die Proben gründlich vor der Durchführung des Tests.** Es müssen sowohl die Probe vor der Übertragung in den 10x-Verdünnungspuffer als auch die verdünnte Probe vor der Testdurchführung vollständig gemischt werden.

1. Zubereitung der verdünnten Proben:

Für flüssige Stuhlproben: Bereiten Sie für jede zu testende Probe ein Kunststoffreagenzröhrchen vor. Geben Sie für jede Probe 450 µl des 1x-Verdünnungspuffers in das jeweilige Reagenzröhrchen. Fügen Sie mit einer Transferpipette 50 µl (konisch erweiterter Bereich) der flüssigen Stuhlprobe in das Reagenzröhrchen mit 1x-Verdünnungspuffer hinzu, um eine 1:10 Verdünnung zu erhalten, und mischen Sie gut mit einem Vortex-Schüttler.

Für halbfeste/feste Stuhlproben: Bereiten Sie für jede zu testende Probe ein Kunststoffreagenzröhrchen vor. Geben Sie für jede Probe 450 µl des 1x-Verdünnungspuffers in das jeweilige Reagenzröhrchen. Geben Sie 0,05 g (konisch erweiterter Bereich oder Abwiegen) der festen Stuhlprobe in das Reagenzröhrchen mit 1x-Verdünnungspuffer, um eine 1:10 Verdünnung zu erhalten, und mischen Sie gut mit einem Vortex-Schüttler.

2. Vortexen Sie die Reagenzröhrchen 10 Sekunden und lagern Sie diese bis zur Testdurchführung zwischen 2 °C und 8 °C. Vortexen Sie erneut, bevor Sie die verdünnte Probe in die Mikrotiterkavität übertragen. Damit ist eine gründliche Durchmischung der Probe gewährleistet.

SERUMPROBENNAHME UND ZUBEREITUNG DER VERDÜNNUNGEN

BITTE BEACHTEN: Blutproben müssen mittels Venenpunktion entnommen werden und natürlich gerinnen. Serum vom Gerinnsel trennen. Lagern Sie die Proben bei -20 °C oder darunter, wenn der Test nicht innerhalb von 7 Tagen nach der Entnahme durchgeführt werden kann. Lassen Sie die Proben bei Raumtemperatur auftauen, und mischen Sie sie vor der Vorbereitung für den Test gut durch. Verdünnte Proben können zwischen 2° und 8°C für bis zu 7 Tage gelagert werden. Testen Sie nach Möglichkeit nur Serumproben, die weniger als 7 Tage alt sind. **Mischen (vortexen) Sie die Proben gründlich vor der Durchführung des Tests.** Es müssen sowohl die Probe vor der Übertragung in den 10x-Verdünnungspuffer als auch die verdünnte Probe vor der Testdurchführung vollständig gemischt werden.

1. Zubereitung der verdünnten Proben:

Für Serumproben: Bereiten Sie für jede zu testende Serumprobe drei Kunststoffreagenzröhrchen vor und beschriften Sie diese. Geben Sie für jede Probe 450 µl des 1x-Verdünnungspuffers in jedes der drei Reagenzröhrchen. Fügen Sie mit einer Transferpipette 50 µl (konisch erweiterter Bereich) der Serumprobe in das erste Reagenzröhrchen mit 1x-Verdünnungspuffer hinzu, um eine 1:10 Verdünnung zu erhalten, und mischen Sie gut mit einem Vortex-Schüttler.

2. Übertragen Sie nun 50 µl (konisch erweiterter Bereich) der 1:10 Verdünnung in das zweite Reagenzröhrchen mit Verdünnungspuffer, um eine 1:100 Verdünnung zu erhalten, und mischen Sie gut mit einem Vortex-Schüttler.
3. Übertragen Sie nun 50 µl aus dem Reagenzröhrchen der 1:100 Verdünnung in das dritte Reagenzröhrchen mit Verdünnungspuffer, um eine 1:1000 Verdünnung zu erhalten, und mischen Sie gut mit einem Vortex-Schüttler.

Vortexen Sie die Reagenzröhrchen 10 Sekunden und lagern Sie diese bis zur Testdurchführung zwischen 2 °C und 8 °C. Vortexen Sie erneut, bevor Sie die verdünnte Probe in die Mikrotiterkavität übertragen. Damit ist eine gründliche Durchmischung der Probe gewährleistet.

TESTVERFAHREN

- Legen Sie die Anzahl der zu verwendenden Kavitäten fest. Geben Sie einen Tropfen *positive Kontrolle* (schwarzer Verschluss) in eine Kavität für die positive Kontrolle. Geben Sie 50 µl (konisch erweiterter Bereich) des 1x-*Verdünnungspuffers* in eine Kavität für die negative Kontrolle. Geben Sie 100 µl (erste Markierung hinter dem konisch erweiterten Bereich) der verdünnten Probe in eine Kavität.

Transferpipette: Kolben 300 µL 200 µL 100 µL 50 µL konisch erweiterte Spitze



- Inkubieren Sie die Kavitäten bei 37 °C ± 2 °C 30 Minuten lang.
- Schütteln Sie den Inhalt der Mikrotiterkavitäten in eine Abfallschale aus.
- Waschen Sie jede Kavität mit der 1x-*Waschlösung* aus einer Spritzflasche mit feiner Düse, indem Sie die 1x-*Waschlösung* jeweils kraftvoll auf den Boden der Kavität richten. Füllen Sie die Kavitäten (nach Füllung etwa 400 µl), und schütteln Sie die 1x-*Waschlösung* aus der Kavität in eine Abfallschale aus. Schlagen Sie die umgedrehte Platte gegen ein trockenes Papiertuch, und wiederholen Sie die Waschschrte **vier Mal**, wobei Sie jedes Mal ein trockenes Papiertuch verwenden. Wenn in den Kavitäten Partikel sichtbar sind, fahren Sie mit dem Waschen fort, bis alle Partikel entfernt sind.
- Geben Sie einen Tropfen *Konjugat* (roter Verschluss) in jede Kavität. Inkubieren Sie die Kavitäten bei 37 °C ± 2 °C 30 Minuten lang.
- Wiederholen Sie die Schritte 3 und 4. Entsorgen Sie alle Papiertücher und Probenbehälter ordnungsgemäß.
- Geben Sie 2 Tropfen *Substrat* (blauer Verschluss) in jede Kavität. Klopfen Sie zum Mischen des Inhalts sanft gegen die Kavitäten. Inkubieren Sie die Kavitäten 15 Minuten lang bei Raumtemperatur. Klopfen Sie während der Inkubationszeit 1 oder 2 Mal sanft gegen die Kavitäten.
- Geben Sie 1 Tropfen *Stopplösung* (gelber Verschluss) in jede Kavität. Klopfen Sie sanft gegen die Kavitäten, und warten Sie bis zum Ablesen 2 Minuten. Durch Zugabe der *Stopplösung* wandelt sich die blaue Färbung in eine gelbe Färbung um. Dieser Effekt wird durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm mit einem ELISA-Lesegerät nachgewiesen. Wischen Sie vor Messung der optischen Dichte die Unterseite jeder Kavität trocken. Wenn Sie ein Lesegerät für zwei Wellenlängen benutzen, lesen Sie bei 450 nm ab und verwenden Sie den Wert bei 620 nm als Referenzwert. Lesen Sie innerhalb von zwei bis zehn Minuten nach Zugabe der *Stopplösung* ab.
- Messen Sie die Absorptionswerte für die positive und negative Kontrolle sowie für alle getesteten Proben.

QUALITÄTSKONTROLLE

Damit der Test gültig ist, müssen die positive und negative Kontrolle folgende Kriterien erfüllen. Die Kavität der positiven Kontrolle muss eine sichtbare gelbe Färbung aufweisen. Wenn mit einem Spektrophotometer abgelesen wird, müssen OD_{450} und $OD_{450/620} > 0,500$ sein. Für die negative Kontrolle muss $OD_{450} < 0,110$ oder $OD_{450/620} < 0,080$ sein. Um sicherzustellen, dass keine Verschleppung stattgefunden hat, wiederholen Sie den Test, wenn eine Probe, die neben einer stark positiven Kavität liegt, ein schwach positives Ergebnis (d. h. $< 0,400$) liefert.

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

Die Messungen müssen mit einem Spektrophotometer für eine Wellenlänge bei 450 nm oder mit einem Spektrophotometer für zwei Wellenlängen bei 450/620 nm vorgenommen werden.

	Spektrophotometrische Messwerte	
	Bei einer Wellenlänge von 450 nm	Bei zwei Wellenlängen von 450/620 nm
Negativ für Stuhlproben	OD < 0,150	OD < 0,110
Positiv für Stuhlproben	OD ≥ 0,150	OD ≥ 0,110
Negativ für Serumproben	OD < 0,110	OD < 0,080
Positiv für Serumproben	OD ≥ 0,110	OD ≥ 0,080

Ein positives Testergebnis bedeutet, dass die Probe ASCA enthält.

Ein negatives Testergebnis bedeutet, dass die Probe keine nachweisbare Konzentration an ASCA enthält.

ERWARTUNGSWERTE

Die Prävalenz von Morbus Crohn wird auf 10-198 Personen/100.000 geschätzt und scheint anzusteigen. Morbus Crohn ist in der nordeuropäischen und nordamerikanischen Bevölkerung am meisten verbreitet (9). Männer und Frauen sind etwa zu gleichen Teilen betroffen.

In 2 separaten Gruppen mit gesunden Personen lieferten insgesamt 98% (57/58) und 96% (90/94) ein negatives Ergebnis für ASCA im Stuhl bzw. Serum. Zwei Probenpanels mit Stuhlproben (211) und Serumproben (186) von nicht an Morbus Crohn leidenden Patienten und gesunden Personen aus Virginia, Indiana, Minnesota, Massachusetts und Deutschland wurden mit dem ASCA-CHEK™-Test getestet. Das Alter der Population lag zwischen 1 und 79 Jahren. Für die 5 regionalen Populationen ergab sich eine Spezifität für Stuhlproben von 90% mit einem 95%-Konfidenzintervall von 85-94%. Für die 5 regionalen Populationen ergab sich eine Spezifität für Serumproben von 93% mit einem 95%-Konfidenzintervall von 88-96%.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Packungsetikett angegeben. Das jeweilige Verfallsdatum für die einzelnen Bestandteile ist auf den einzelnen Etiketten angegeben. Das Kit mit den Reagenzien von bestimmter Haltbarkeit muss zwischen 2 °C und 8 °C gelagert und nach dem Gebrauch so schnell wie möglich wieder in den Kühlschrank gestellt werden.

LEISTUNGSDATEN

An der klinischen Prüfung des ASCA-CHEK™-Tests mit Stuhlproben nahmen 250 Patienten mit CED, 45 RDS-Patienten, die nicht an Morbus Crohn litten, sowie 58 gesunde Kontrollpersonen an 5 separaten Studienstandorten (4 klinische und 1 interner Standort) teil. In der CED-Gruppe befanden sich 142 Patienten mit Morbus Crohn und 108 Patienten mit Colitis ulcerosa. Männer und Frauen waren etwa im Verhältnis 1:1 beteiligt, und insgesamt 40% der Patienten waren bis zu 18 Jahren alt. Die Stuhlkonsistenz reichte von fest bis flüssig und zeigte im Test eine akzeptable Reaktivität. Insgesamt 57% der Patienten mit Morbus Crohn waren beim ASCA-CHEK™-Test positiv. Die kombinierte Analyse für alle 5 Standorte zeigte eine Sensitivität von 57% und eine Spezifität von 91%, wobei die Gesamtkorrelation mit klinisch bestätigtem Morbus Crohn 77% betrug. Tabelle 1 zeigt die Testergebnisse für die kombinierte Analyse aller 4 Studienstandorte und des einen internen Standortes.

Tabelle 1. Ergebnisse des ASCA-CHEK™-Tests von 4 klinischen Studienstandorten und 1 internen Standort für die Unterscheidung von Morbus Crohn und nicht Morbus Crohn anhand von Stuhlproben.

Anzahl der Stuhlproben = 353	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa, RDS und nicht-CED
Positiv bei ASCA-CHEK™-Test	81	20
Negativ bei ASCA-CHEK™ -Test	61	191

		95%-Konfidenz-Intervalle
Sensitivität	57%	49 - 65%
Spezifität	91%	86 - 94%
Korrelation	77%	73 - 81%

An einer separaten klinischen Prüfung des ASCA-CHEK™-Tests mit Serumproben nahmen 218 Patienten mit CED, 39 RDS-Patienten, die nicht an Morbus Crohn litten, sowie 94 gesunde Kontrollpersonen an 5 separaten Studienstandorten (4 klinische und 1 interner Standort) teil. In der CED-Gruppe befanden sich 172 Patienten mit Morbus Crohn und 46 Patienten mit Colitis ulcerosa. Männer und Frauen waren etwa im Verhältnis 1:1 beteiligt, und insgesamt 40% der Patienten waren bis zu 19 Jahren alt. Insgesamt 62% der Patienten mit Morbus Crohn waren beim ASCA-CHEK™-Test positiv. Die kombinierte Analyse für alle 5 Standorte zeigte eine Sensitivität von 62% und eine Spezifität von 93%, wobei die Gesamtkorrelation mit klinisch bestätigtem Morbus Crohn 78% betrug. Tabelle 2 und 3 zeigen die Ergebnisse des ASCA-CHEK™-Tests sowie eines handelsüblichen ASCA-Tests im Vergleich zu klinischen Untersuchungen.

Tabelle 2. Ergebnisse des ASCA-CHEK™-Tests von 4 klinischen Studienstandorten und 1 internen Standort für die Unterscheidung von Morbus Crohn und nicht Morbus Crohn anhand von Serumproben.

Serum Anzahl = 351	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa, RDS und nicht-CED
Positiv bei ASCA-CHEK™-Test	107	13
Negativ bei ASCA-CHEK™ -Test	65	166

		95%-Konfidenz-Intervalle
Sensitivität	62%	55 - 69%
Spezifität	93%	88 - 96%
Korrelation	78%	73 - 82%

Tabelle 3. Ergebnisse des handelsüblichen ASCA-Tests von 4 klinischen Studienstandorten und 1 internen Standort für die Unterscheidung von Morbus Crohn und nicht Morbus Crohn anhand von Serumproben.

Serum Anzahl = 274	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa, RDS und nicht-CED
Positiv bei handelsüblichem ASCA-Test	89	7
Negativ bei handelsüblichem ASCA-Test	51	127

		95%-Konfidenz-Intervalle
Sensitivität	64%	55 - 71%
Spezifität	95%	89 - 98%
Korrelation	79%	74 - 83%

An einer Vergleichsstudie zwischen ASCA im Serum und ASCA im Stuhl nahmen insgesamt 82 CED-Patienten (45% Erwachsene und 55% Kinder) teil. Von jedem Teilnehmer wurden je eine Stuhl- und Serumprobe entnommen. Die Serumproben wurden mit einem handelsüblichen ASCA-IgG-EIA getestet, die Stuhlproben wurden mit dem ASCA-CHEK™-Test analysiert. Insgesamt waren 5 ASCA-positive Stuhlproben IgG-negativ für ASCA im Serum, wobei 4 dieser Proben von Patienten mit Morbus Crohn stammten. Die statistische Vergleichsanalyse der beiden Tests zeigte eine prozentuale positive Übereinstimmung von 70% und eine prozentuale negative Übereinstimmung von 88%. Die Gesamtübereinstimmung betrug 79%. Tabelle 4 zeigt die einzelnen Testergebnisse für die Vergleichsstudie mit Serum- und Stuhlproben.

Tabelle 4. Vergleichsstudie zwischen dem ASCA-CHEK™-Test und einem handelsüblichen IgG-ELISA für ASCA im Serum mit gepaarten Stuhl- bzw. Serumproben.

Anzahl = 82	Handelsüblicher IgG-ELISA f. ASCA im Serum Positiv	Handelsüblicher IgG-ELISA f. ASCA im Serum Negativ
ASCA-CHEK™ - Test Positiv	28	5
ASCA-CHEK™ - Test Negativ	12	37

		95%-Konfidenz-Intervalle
Positive Übereinstimmung in %	70%	53 - 83%
Negative Übereinstimmung in %	88%	74 - 96%
Gesamtübereinstimmung in %	79%	70 - 86%

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Stuhlproben folgender Patienten sollten nicht mit dem ASCA-CHEK™-Test analysiert werden: Patienten mit HIV und/oder Hepatitis B und C in der Vorgeschichte, Patienten mit vorangegangener infektiöser Diarrhoe (innerhalb von 6 Monaten) sowie Patienten, die vor bis zu einem Monat einer Kolostomie und/oder Ileostomie unterzogen wurden.
2. Die in der Packungsbeilage empfohlenen Verdünnungen für Stuhl- und Serumproben wurden in klinischen Studien geprüft und erwiesen sich als optimal für Testergebnisse. Daher sollten nur die empfohlenen Verdünnungen verwendet werden.
3. Ausschließlich Stuhl- und Serumproben wurden mit dem ASCA-CHEK™-Test klinisch evaluiert.
4. Stuhlproben, die in 10% Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol konserviert oder nach einem Bariumeinlauf entnommen wurden, dürfen nicht verwendet werden. Serumproben mit mikrobieller Kontamination bzw. wärmebehandelte Serumproben dürfen nicht getestet werden.
5. Ein positives Ergebnis des ASCA-CHEK™-Tests weist darauf hin, dass Antikörper gegen *S. cerevisiae* vorhanden sind, und bedeutet ohne Berücksichtigung der klinischen Vorgeschichte des Patienten oder körperliche Untersuchung nicht notwendigerweise, dass Morbus Crohn vorliegt.
6. Proben von Patienten mit chronischer Lebererkrankung und Hypergammaglobulinämie wurden nicht mit dem ASCA-CHEK™-Test auf ein mögliches Vorhandensein von ASCA im Stuhl geprüft.
7. Möglicherweise stimmen die Ergebnisse für ASCA im Stuhl und im Serum nicht überein.

KREUZREAKTIVITÄT FÜR STUHLPROBEN

Es wurden verschiedene im Darm angesiedelte Organismen auf Kreuzreaktivität mit dem ASCA-CHEK™-Test untersucht. Für die Analyse wurde eine ASCA-negative Stuhlprobe mit Medienkulturen versetzt und gemäß der Packungsbeilage mit dem ASCA-CHEK™-Test getestet. Keiner der folgenden Organismen reagierte im ASCA-CHEK™-Test. Der ASCA-CHEK™-Test wurde nicht auf mögliche Kreuzreaktivität mit enteralen Viren geprüft.

Aeromonas hydrophila

Bacillus cereus

Bacillus subtilis

Bacteroides fragilis

Campylobacter coli

Campylobacter jejuni

Candida albicans

Clostridium butyricum

Clostridium difficile (non-toxigenic) VPI 11186

Clostridium difficile (toxigenic) VPI 10463

Clostridium difficile (ToxA-/ToxB+) 8864

Clostridium perfringens Type A

Clostridium septicum

Clostridium sordellii

Clostridium sporogenes

Enterobacter cloacae

Escherichia coli EIEC SD67

Escherichia coli ETEC E2348169

Escherichia coli O157:H7

Escherichia coli

Helicobacter pylori

Klebsiella pneumoniae

Porphyromonas asaccharolytica

Proteus vulgaris

Pseudomonas aeruginosa

Salmonella typhimurium

Serratia liquefaciens

Shigella dysenteriae

Shigella flexneri

Shigella sonnei

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Streptococcus faecalis

Peptostreptococcus anaerobius

INTERFERIERENDE SUBSTANZEN FÜR SERUM

Mögliche interferierende Substanzen im Serum wurden im ASCA-CHEK™-Test getestet. Jede Substanz wurde auf mögliche Interferenz mit ASCA-positiven und ASCA-negativen Serumproben getestet. Es wurde keine Interferenz in den getesteten Serumproben beobachtet. Tabelle 5 zeigt die Konzentrationen und Messverfahren für jede getestete Substanz.

Tabelle 5. Im ASCA-CHEK™-Test getestete interferierende Substanzen.

Testsubstanz	Analyseverfahren	Serumkonzentration
Lipase	Hitachi 917	> 20 E/L
Cholesterin	Olympus AU5000	504 mg/dl
Hämolysiertes Blut	Sichtbare rote Farbe	Hämolysiert
Rheumafaktor (RF)	Nephelometrie	27,9 IE/ml
Antinukleäre Antikörper (ANA)	Nephelometrie	0,263 (Ratio)
Bilirubin F (frei)	Beckman LX20	19 mg/dl
Bilirubin C (konjugiert)	Beckman LX20	18 mg/dl

INZIDENZ VON ASCA IM SERUM BEI NICHT-MC-GRUPPEN

Seren aus nicht-Morbus-Crohn-Gruppen wurden mit dem ASCA-CHEK™-Test getestet und ergaben einen Positivitätsbereich von 4%-13%. Tabelle 6 zeigt die einzelnen Gruppen mit der entsprechenden Positivrate in %. ASCA im Serum kann auch bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden (10).

Tabelle 6. Inzidenz von ASCA im Serum bei nicht-MC-Gruppen.

nicht-Morbus-CrohnGruppe	Anzahlgetestete	Anzahl positiv	%positiv
Colitis ulcerosa	46	6	13%
Reizdarmsyndrom	30	3	10%
Obstipation	1	0	0%
Ösophagitis	1	0	0%
<i>H. pylori</i>	1	0	0%
Alkoholbedingte Leberzirrhose	20	1	5%
ANA-positiv	3	0	0%
Gesund	94	4	4%

REPRODUZIERBARKEIT UND PRÄZISION

Die Inter-Assay-Variation für Stuhlproben wurde mit 8 ASCA-positiven und 4 ASCA-negativen Stuhlproben bestimmt, die in einem Zeitraum von 6 Tagen 3x getestet wurden. Während des Testzeitraums blieben alle positiven Proben positiv und alle negativen negativ. Die Intra-Assay-Variation wurde mit 18 Stuhlproben – 13 ASCA-positiven und 5 ASCA-negativen – bestimmt, die jeweils in 8 Replikaten in einem einzelnen Testlauf getestet wurden. Während des Testzeitraums blieben alle positiven Proben positiv und alle negativen negativ.

Die Inter-Assay-Variation für Serumproben wurde mit 4 ASCA-positiven und 4 ASCA-negativen Serumproben bestimmt, die 8x in einem Zeitraum von 2 Tagen getestet wurden. Während des Testzeitraums blieben alle positiven Proben positiv und alle negativen negativ. Die Intra-Assay-Variation für Serum wurde mit 4 ASCA-positiven und 4 ASCA-negativen Serumproben bestimmt, die jeweils in 8 Replikaten in einem einzelnen Testlauf getestet wurden. Während des Testzeitraums blieben alle positiven Proben positiv und alle Negativen negativ.

UTILISATION PRÉVUE

Le test ASCA-CHEK™ est un dosage immunoenzymatique (ELISA) destiné à la détection qualitative des anticorps anti-*S. cerevisiae* (ASCA) humains dans les selles et le sérum. Le résultat du test sert d'aide au diagnostic de la maladie de Crohn, en le combinant aux résultats cliniques et à ceux obtenus en laboratoire.
POUR UNE UTILISATION DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

Attention : selon la loi fédérale des États-Unis, ce dispositif ne peut être vendu que par un médecin ou sur ordonnance.

EXPLICATION

Nous estimons à 1 million le nombre d'Américains souffrant d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), qui englobe la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique (1). Les MICI se caractérisent par une réponse inflammatoire chronique qui entraîne des dommages histologiques de la paroi de l'intestin. La maladie de Crohn peut impliquer l'ensemble du canal gastro-intestinal, et l'inflammation peut s'étendre à la muqueuse transmurale, alors que la recto-colite hémorragique peut uniquement affecter le gros intestin et l'inflammation peut toucher la muqueuse. Ces deux pathologies distinctes nécessitent un diagnostic différentiel rapide pour un traitement optimal. Les méthodes conventionnelles s'appuyant sur des examens par endoscopie et des analyses histologiques peuvent prendre plusieurs années avant de permettre la confirmation d'un diagnostic (2). Les méthodes de test permettant de déterminer la présence d'ASCA dans le sérum sanguin en tant qu'indicateur de la maladie de Crohn sont actuellement disponibles, avec des sensibilités comprises entre 35 et 70% (3-6).

Le test ASCA-CHEK™ est un dosage immunoenzymatique permettant de dépister les ASCA dans les selles et le sérum humains. Le test propose un procédé utilisant des antigènes de *Saccharomyces cerevisiae* permettant de mesurer la quantité totale d'ASCA dans les selles et le sérum ; cet outil diagnostique peut permettre de distinguer la maladie de Crohn d'autres pathologies gastro-intestinales telles que la recto-colite hémorragique et le syndrome du côlon irritable.

PRINCIPE DU TEST

Le test ASCA-CHEK™ détecte les anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). Les micropuits fournis dans le kit contiennent des antigènes immobilisés de *Saccharomyces cerevisiae*. Le *Conjugué* se compose d'anticorps d'anti-immunoglobuline humaine conjugués à de la peroxydase de raifort. Dans l'essai, une aliquote d'un échantillon de selles ou de sérum est émulsifiée dans le *Diluant* et l'échantillon dilué est transféré dans le micropuits. Si des ASCA sont présents dans l'échantillon, ils sont liés aux échantillons immobilisés. Après incubation, les puits sont lavés et le *Conjugué* est ajouté. Le *Conjugué* se lie aux ASCA captés par les antigènes immobilisés. Les produits non liés sont ensuite éliminés par une seconde série de lavages. L'adjonction du *Substrat* entraîne une modification de la coloration suite à la formation d'un complexe enzyme-anticorps-antigène en présence d'ASCA.

REACTIFS

DIL 10X

Diluant 10X, 40 ml (solution concentrée 10X de protéine tamponnée au phosphate contenant du thimérol à 0,2 %)*. Le *Diluant* 1X est également utilisé en tant que contrôle négatif (voir PROCÉDURE DE TEST).

Mot indicateur : Avertissement

H373 : Peut endommager les organes en cas d'exposition prolongée ou répétée

H411: Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P260, P273, P314, P391, P501

CONJ ENZ

Conjugué, 7 ml (immunoglobuline polyclonale de chèvre anti-humaine - Peroxydase de raifort dans une solution tamponnée contenant du thimérol à 0,02%)*



SUBS REAG
CONTROL +

Substrat, 14 ml (substrat de tétraméthylbenzidine et peroxyde).

Contrôle positif, 3,5 ml (ASCA humaine dans une solution de protéine tamponnée contenant du thimérosal à 0,02%)*.

WASHBUF 20X

Tampon de lavage concentré, 50 ml (concentré à 20X contenant une solution saline tamponnée au phosphate, un détergent et du thimérosal à 0,2%)*.

Mot indicateur : Avertissement

H373 : Peut endommager les organes en cas d'exposition prolongée ou répétée

H411: Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P260, P273, P314, P391, P501



H₂SO₄ 0.6N

Solution d'arrêt, 7 ml (0,6 N d'acide sulfurique). ATTENTION : éviter tout contact avec la peau. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau.

Mot indicateur : Danger

H314 : Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361,

P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501



MA PLT

Micropiaques, 12 bandes, 8 micropuits par bande, enduits d'antigènes de *Saccharomyces cerevisiae* (sous emballage contenant un agent de dessiccation)

*contient du mercure



Matériel fourni

2 Films adhésifs plastiques

100 pipettes de transfert évasées (élément évasé = 50 µl)

Matériel et équipement nécessaires mais non fournis

Pulvérisateur pour *Solution de lavage* 1X

Tubes de dilution de l'échantillon

Réceptacle à déchets/Papier absorbant

Bouteille de *Diluant* 1X

Lecteur ELISA capable d'effectuer une lecture à 450 nm ou à 450/620 nm

Agitateur vortex

Réfrigérateur de stockage

Eau déionisée ou distillée

Incubateur à 37°C

PRÉCAUTIONS À PRENDRE

1. Rx Only - Sur ordonnance uniquement
2. Uniquement à usage professionnel.
3. Les réactifs des différents kits ne doivent pas être mélangés. Ne pas utiliser le kit si la date d'expiration est dépassée.
4. Ne pas congeler les réactifs. Conserver le kit à une température comprise entre 2° et 8°C.
5. Les réactifs doivent être à température ambiante avant utilisation.
6. Mélanger doucement les réactifs avant utilisation.
7. Les capsules et les embouts sont classés par couleur. Ne pas les mélanger !
8. Lors des manipulations, éviter d'effleurer le fond des micropuits, toute dégradation pouvant entraîner une lecture élevée de l'absorbance.
9. Tenir les compte-gouttes en position verticale de façon à dispenser des gouttes de réactif de taille adéquate.
10. Les micropuits non utilisés doivent être réintroduits sans attendre dans leur emballage refermable contenant un dessiccateur pour les protéger de l'humidité.
11. Le lavage doit être réalisé suivant les consignes indiquées afin d'éviter toute réaction hors essai.
12. Utiliser les échantillons de selles et de sérum respectivement dans les 48 heures et les 7 jours suivant le prélèvement pour obtenir des résultats optimaux. Bien qu'un cycle de congélation-décongélation soit acceptable, les échantillons congelés

(-20°C ou moins) peuvent perdre leur activité si les cycles de congélation-décongélation sont trop fréquents.

13. Le *Substrat* est photosensible et ne doit pas être directement exposé à la lumière solaire ou à une source de rayons UV. Si une coloration apparaît suite à une exposition du *Substrat* à la lumière, celui-ci doit être éliminé.
14. La contamination microbienne des réactifs peut réduire l'exactitude de l'analyse. Éviter la contamination microbienne des réactifs en utilisant des pipettes stériles jetables pour extraire les aliquotes des flacons à réactifs.
15. La procédure de test spécifiée permet d'obtenir les meilleurs résultats. Les concentrations, les conditions d'incubation et les spécifications de traitement ont été optimisées de façon à rendre le test sensible et spécifique. Toute modification de la procédure spécifiée et/ou des conditions de test peut altérer la sensibilité et la spécificité du test.
16. Le *Contrôle positif* contient des ASCA, un produit humain dérivé. La substance a été testée et a présenté des résultats négatifs pour les anticorps anti-VIH-1, VIH-2, HCV et HbsAg. Aucune méthode de test connue ne garantit l'absence totale d'agents infectieux. L'ENSEMBLE DES PRODUITS HUMAINS DOIVENT ETRE MANIPULES EN TANT QUE PRODUITS POTENTIELLEMENT INFECTIEUX. Un procédé de protection contre les risques biologiques est publié dans le Manual of Biosafety in Microbiology & Biomedical Laboratories du CDC/NIH.
17. Manipuler les échantillons et micropuits utilisés comme tout facteur potentiel de transmission d'agents infectieux. Utiliser des gants pour effectuer les tests.
18. Le *Diluant 10X* et le *Tampon de lavage concentré 20X* contiennent du Thimérolal 0,2 % comme conservateur. Une fois diluées à une concentration normale d'utilisation, ces solutions sont classées comme non dangereuses. La *Solution d'arrêt* contient 0,6 N d'acide sulfurique. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. Les vêtements contaminés doivent être ôtés puis lavés avant d'être réutilisés. Manipuler les réactifs selon les réglementations existantes relatives à la sécurité des laboratoires et les bonnes pratiques de laboratoire. Les fiches de sécurité de ce produit sont disponibles à la demande. Contacter le support technique.
19. Respecter les arrêtés locaux, régionaux et nationaux relatifs aux réglementations sur l'élimination des déchets. Ne pas les jeter avec les déchets ménagers mais avec les matières dangereuses.

PREPARATIONS PRELIMINAIRES

1. Tous les réactifs doivent se trouver à température ambiante avant application dans l'essai.
2. **Préparer la *Solution de lavage* à 1X.** La *Solution de lavage* se trouve sous forme de concentré à 20X (un précipité peut être observé et est acceptable). Verser 50 ml de concentré dans 950 ml d'eau déionisée pour obtenir un volume total d'un litre. Étiqueter la bouteille. Conserver toute *Solution de lavage* 1X non utilisée à une température comprise entre 2° et 8°C.
3. **Préparer le *Diluant 1X*.** Le *Diluant* est fourni sous forme de concentré à 10X (un précipité peut être observé et est acceptable). Verser 40 ml de concentré dans 360 ml d'eau déionisée pour obtenir un volume total de 400 ml. Étiqueter la bouteille. Conserver tout *Diluant 1X* non utilisé à une température comprise entre 2° et 8°C.
4. **Préparation de la *microplaque*.** Chaque bande contient 8 micropuits enduits d'antigènes de *Saccharomyces cerevisiae*. Chaque échantillon ou solution de contrôle nécessite un de ces micropuits enduits. Éviter tout contact avec le fond des micropuits, il s'agit de la partie utilisée par les lecteurs ELISA. Les micropuits inutilisés doivent être immédiatement remis dans le sachet plastique et ce dernier doit être fermé hermétiquement avec l'agent de dessiccation.
5. Tous les réactifs, excepté le *Tampon de lavage concentré* et le *Diluant 10X*, sont fournis dans des flacons prêts à l'emploi. Les réactifs peuvent être dispensés directement à l'aide des compte-gouttes ; ils peuvent également être transvasés puis dispensés à l'aide de pipettes multicanaux. Après transvasement, tout surplus de réactif devra être éliminé. Ne pas réintroduire dans le flacon original. Le *Substrat* doit être maintenu dans son récipient opaque d'origine et extrait de ce récipient suivant

besoin. Après extraction, le *Substrat* inutilisé ne doit pas être réintroduit dans son récipient d'origine.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS FÉCAUX ET PRÉPARATION DE DILUTIONS

REMARQUE : Les méthodes internes standard de prélèvement et de manipulation des échantillons de selles sont appropriées. Ne pas utiliser des échantillons collectés ou conservés dans 10 % de formol, de formol thimérosal, dans du formol d'acétate de sodium ou d'alcool polyvinylique. Conserver les échantillons à -20°C si le test ne peut être réalisé dans un délai de 48 heures après le prélèvement. Laisser décongeler les échantillons à température ambiante et bien mélanger avant de préparer l'échantillon. Conserver les échantillons dilués à une température comprise entre 2° et 8°C jusqu'à 48 heures. Si possible, tester les échantillons de selles de moins de 48 heures. **Bien mélanger (mixer) les échantillons avant l'essai.** Ceci inclut le mélange complet de l'échantillon avant de le transférer sur le *Diluant 1X* ainsi que le mélange complet de l'échantillon dilué avant de réaliser l'essai.

1. Préparer des échantillons dilués :

Pour des échantillons de selles liquides : Préparer un tube plastique pour chaque échantillon à tester. Pour chaque échantillon, ajouter 450 µl de *Diluant 1X* à chaque tube. Utiliser une pipette de transfert pour ajouter 50 µl (élément évasé) de l'échantillon de selles liquide au tube contenant du *Diluant 1X* pour une dilution 1:10 et bien mélanger en utilisant un agitateur vortex.

Pour des échantillons de selles formées/solides : Préparer un tube plastique pour chaque échantillon à tester. Pour chaque échantillon, ajouter 450 µl de *Diluant 1X* à chaque tube. Ajouter 0,05 g (élément évasé) ou peser 0,05 g d'échantillon de selles solides au tube contenant du *Diluant 1X* pour une dilution 1 : 10 et bien mélanger en utilisant un agitateur vortex.

2. Agiter les tubes pendant 10 secondes et les conserver à une température comprise entre 2° et 8°C jusqu'à réalisation du test. Agiter une fois de plus avant de transférer l'échantillon dilué vers le micropuits. Cette opération garantit un bon mélange de l'échantillon.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SÉRUM ET PRÉPARATION DE DILUTIONS

REMARQUE : les échantillons sanguins doivent être prélevés par ponction veineuse et leur coagulation doit être naturelle. Séparer le sérum du caillot. Conserver les échantillons non dilués à -20°C si le test ne peut être réalisé dans un délai de 7 jours après le prélèvement. Laisser décongeler les échantillons à température ambiante et bien mélanger avant de préparer l'échantillon. Les échantillons dilués peuvent être conservés entre 2° et 8°C pendant un maximum de 7 jours. Si possible, tester les échantillons de sérum de moins de 7 jours. **Bien mélanger (mixer) les échantillons avant l'essai.** Ceci inclut le mélange complet de l'échantillon avant de le transférer sur le *Diluant 1X* ainsi que le mélange complet de l'échantillon dilué avant de réaliser l'essai.

1. Préparer des échantillons dilués :

Pour les échantillons de sérum : préparer et étiqueter 3 tubes en plastique pour chaque échantillon de sérum à tester. Pour chaque échantillon, ajouter 450 µl de *Diluant 1X* dans chacun des trois tubes. Utiliser une pipette de transfert pour ajouter 50 µl (élément évasé) de l'échantillon de sérum dans le premier tube contenant du *Diluant 1X* pour une dilution au 1/10 et bien mélanger en utilisant un agitateur vortex.

2. Ensuite, transférer 50 µl (élément évasé) de la dilution au 1/10 dans le deuxième tube contenant le *Diluant* pour une dilution au 1/100 et bien mélanger à l'aide d'un agitateur vortex.

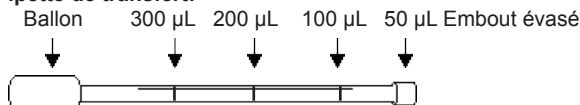
3. Ensuite, transférer 50 µl du tube contenant la dilution au 1/100 dans le troisième tube avec le *diluant* pour obtenir une dilution au 1/1000 et bien mélanger à l'aide d'un agitateur vortex.

Agiter les tubes pendant 10 secondes et les conserver à une température comprise entre 2° et 8°C jusqu'à réalisation du test. Agiter une fois de plus avant de transférer l'échantillon dilué vers les micropuits. Cette opération garantit un bon mélange de l'échantillon.

PROCÉDURE DE TEST

1. Déterminer le nombre de micropuits à utiliser. Ajouter 1 goutte de *Contrôle Positif* (capsule noire) au micropuits de contrôle positif. Ajouter 50 µl (élément évasé) de *Diluant* 1X dans un puits de contrôle négatif. Ajouter 100 µl (premier repère après la partie évasée) d'échantillon dilué dans un micropuits.

Pipette de transfert:



2. Incuber les micropuits à 37°C ± 2°C pendant 30 minutes.
3. Secouer le contenu hors des micropuits dans un réceptacle à déchets.
4. Nettoyer les micropuits en projetant énergiquement la *Solution de lavage* 1X à l'aide d'un pulvérisateur à jet continu vers le fond de chaque micropuits. Remplir les micropuits (environ 400 µl une fois remplis), puis secouer la *Solution de lavage* 1X hors du micropuits dans un réceptacle à déchets. Rabattre la plaque à l'envers sur une serviette en papier sèche et répéter **quatre fois** les étapes de lavage en utilisant une serviette en papier sèche à chaque fois. Si des particules sont visibles dans les micropuits, continuer le lavage jusqu'à disparition complète de ces dernières.
5. Ajouter une goutte de *Conjugué* (capsule rouge) dans chaque micropuits. Incuber les micropuits à 37°C ± 2°C pendant 30 minutes.
6. Reprendre les étapes 3 et 4. Jeter toutes les serviettes en papier et récipients à échantillons selon les règles établies.
7. Verser 2 gouttes de *Substrat* (capsule bleue) dans chaque micropuits. Tapoter légèrement sur les micropuits pour mélanger le contenu. Laisser incuber les micropuits à température ambiante pendant 15 minutes. Tapoter légèrement les micropuits 1 à 2 fois pendant la période d'incubation.
8. Verser 1 goutte de *Solution d'arrêt* (capsule jaune) dans chaque micropuits. Tapoter légèrement les micropuits et attendre 2 minutes avant d'effectuer la lecture. Lors de l'adjonction de la *Solution d'arrêt*, la couleur bleue vire au jaune. Cette modification peut être détectée en mesurant la densité optique à une longueur d'onde de 450 nm sur un lecteur ELISA. Essuyer le dessous de chaque micropuits pour enlever l'humidité avant de mesurer la densité optique. Pour les lecteurs à double longueur d'onde, effectuer la lecture à 450 nm et se référer à 620 nm. Effectuer la lecture entre deux et dix minutes après l'adjonction de la *Solution d'arrêt*.
9. Enregistrer les valeurs d'absorbance pour le contrôle positif, le contrôle négatif et chaque échantillon testé.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Les contrôles positif et négatif doivent répondre aux critères suivants, faute de quoi le test est invalide. Le micropuits de contrôle doit être d'aspect jaune. Si la lecture se fait sur un spectrophotomètre, le résultat des DO_{450} et $DO_{450/620}$ doit être supérieur à 0,500. Le contrôle négatif doit être inférieur à 0,110 DO_{450} ou inférieur à 0,080 $DO_{450/620}$. Pour vérifier l'absence de contamination, réitérer le test si un échantillon présente un résultat positif contestable (soit inférieur à 0,400) et se trouve à proximité d'un micropuits dont la positivité est sans conteste.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les mesures doivent être effectuées à 450 nm sur un spectrophotomètre à longueur d'onde unique ou à 450/620 nm sur un spectrophotomètre à longueur d'onde double.

	Mesure spectrophotométrique	
	Longueur d'onde simple à 450 nm	Longueur d'onde double à 450/620 nm
Négatif pour les échantillons fécaux	DO < 0,150	DO < 0,110
Positif pour les échantillons fécaux	DO ≥ 0,150	DO ≥ 0,110
Négatif pour les échantillons sériques	DO < 0,110	DO < 0,080
Positif pour les échantillons sériques	DO ≥ 0,110	DO ≥ 0,080

Un résultat positif indique que l'échantillon contient de l'ASCA.

Un résultat négatif au test indique que l'échantillon ne contient pas une quantité détectable d'ASCA.

VALEURS ATTENDUES

La prévalence de la maladie de Crohn est estimée de 10 à 198 personnes/100 000 et semble en augmentation. La maladie de Crohn est plus courante dans les populations d'Europe du Nord et d'Amérique du Nord (9). Ceci affecte les hommes et les femmes dans des proportions approximativement équivalentes.

Dans deux groupes distincts de sujets sains, 98 % (57/58) et 96 % (90/94) ont été testés positifs pour les ASCA respectivement dans les selles et dans le sérum. Deux panels d'échantillons de selles (211) et de sérum (186) prélevés chez des patients ne souffrant pas de la maladie de Crohn et des sujets sains des états de Virginie, de l'Indiana, du Minnesota, du Massachusetts et d'Allemagne ont été soumis au test **ASCA-CHEK™**. L'âge de la population s'étendait d'1 à 79 ans. Pour les 5 populations régionales, la spécificité pour les échantillons fécaux était de 90 %, soit entre 85 et 94 % avec un intervalle de confiance de 95 %. Pour les 5 populations régionales, la spécificité pour les échantillons sériques était de 93 %, soit entre 88 et 96 % avec un intervalle de confiance de 95 %.

DURÉE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'expiration du kit est indiquée sur l'étiquette extérieure. La date d'expiration de chaque composant est indiquée sur chaque étiquette. Le kit contenant les réactifs dont la durée de conservation est indiquée doit être conservé à une température comprise entre 2° et 8°C et remis au réfrigérateur aussitôt que possible après utilisation.

EFFICACITÉ DU TEST

Dans l'évaluation clinique du test **ASCA-CHEK™** sur des échantillons de selles, 250 patients souffrant d'une MICI, 45 patients souffrant d'une colopathie fonctionnelle hors maladie de Crohn et 58 sujets sains ont été recrutés sur 5 sites d'étude différents (4 sites cliniques et 1 site interne). Dans le groupe MICI, 142 patients présentaient une maladie de Crohn et 108 souffraient de recto-colite hémorragique. Le rapport homme/femme était approximativement de 1:1 et 40 % des patients étaient âgés de 18 ans ou moins. La consistance des selles variait de solide à liquide et tous les échantillons ont présenté une réactivité acceptable à l'essai. 57% des patients souffrant de la maladie de Crohn se sont révélés positifs au test **ASCA-CHEK™**. L'analyse combinée pour les 5 sites a mis en avant une sensibilité et une spécificité de 57% et 91% respectivement, avec une corrélation globale de 77% pour maladie de Crohn confirmée cliniquement. Le tableau 1 montre les résultats aux tests pour l'analyse combinée des 4 sites d'étude et du site interne.

Tableau 1. Résultats du test ASCA-CHEK™ sur 4 sites d'étude clinique et 1 site interne pour distinguer la maladie de Crohn d'autres maladies sur des selles.

Selles N=353	Maladie de Crohn	Recto-colite hémorragique, syndrome du côlon irritable et sans MICI
Test ASCA-CHEK™ positif	81	20
Test ASCA-CHEK™ négatif	61	191

		Intervalles de confiance de 95%
Sensibilité	57%	49 - 65%
Spécificité	91%	86 - 94%
Corrélation	77%	73 - 81%

Dans une évaluation clinique distincte du test ASCA-CHEK™ sur des échantillons de sérum, 218 patients souffrant d'une MICI, 39 patients souffrant d'un syndrome du côlon irritable hors maladie de Crohn et 94 sujets sains ont été recrutés sur 5 sites d'étude différents (4 sites cliniques et 1 site interne). Dans le groupe MICI, 172 patients présentaient une maladie de Crohn et 46 souffraient de recto-colite hémorragique. Le rapport homme/femme était approximativement de 1:1 et 40 % des patients étaient âgés de 19 ans ou moins. 62 % des patients souffrant de la maladie de Crohn se sont révélés positifs au test ASCA-CHEK™. L'analyse combinée pour les 5 sites a mis en avant une sensibilité et une spécificité de 62% et 93% respectivement, avec une corrélation globale de 78% pour maladie de Crohn confirmée cliniquement. Les tableaux 2 et 3 montrent les résultats comparatifs entre le test ASCA-CHEK™ et un test commercialisé des ASCA, par rapport aux examens cliniques.

Tableau 2. Résultats du test ASCA-CHEK™ sur 4 sites d'étude clinique et 1 site interne pour distinguer la maladie de Crohn d'autres maladies sur des échantillons de sérum.

Sérum N=351	Maladie de Crohn	Recto-colite hémorragique, syndrome du côlon irritable et sans MICI
Test ASCA-CHEK™ positif	107	13
Test ASCA-CHEK™ négatif	65	166

		Intervalles de confiance de 95%
Sensibilité	62%	55 - 69%
Spécificité	93%	88 - 96%
Corrélation	78%	73 - 82%

Tableau 3. Résultats du test commercialisé des ASCA sur 4 sites d'étude clinique et 1 site interne pour distinguer la maladie de Crohn d'autres maladies sur des échantillons de sérum.

Sérum N = 274	Maladie de Crohn	Recto-colite hémorragique, syndrome du côlon irritable et sans MICI
Test commercialisé ASCA positif	89	7
Test commercialisé ASCA négatif	51	127

		Intervalles de confiance de 95%
Sensibilité	64%	55 - 71%
Spécificité	95%	89 - 98%
Corrélation	79%	74 - 83%

Dans une étude comparative entre l'ASCA sanguin et l'ASCA retrouvé dans les selles, un total de 82 patients avec MICI (45 % de patients adultes et 55 % de patients pédiatriques) ont été recrutés et des échantillons appariés de selles et de sérum ont été prélevés auprès de chaque sujet. Les échantillons de sérum sanguin ont été testés sur un sérum sanguin commercial ASCA IgG EIA et les échantillons de selles ont été analysés à l'aide du test ASCA-CHEK™. Un total de 5 échantillons de selles positifs à l'ASCA étaient négatifs à l'IgG d'ASCA sanguin, et quatre d'entre eux provenaient de patients souffrant de la maladie de Crohn. L'analyse statistique comparative entre les deux essais a montré un pourcentage de confirmation positif de 70% et un pourcentage de confirmation négatif de 88%, pour une confirmation globale de 79%. Le tableau 4 présente les résultats détaillés du test pour l'étude comparative échantillon sanguin/prélèvement de selles.

Tableau 4. Étude comparative effectuée entre le test ASCA-CHEK™ et un sérum sanguin commercialisé ASCA IgG EIA utilisant respectivement des échantillons de selles et de sérum sanguin appariés.

N = 82	Sérum commercialisé ASCA IgG ELISA Positif	Sérum commercialisé ASCA IgG ELISA Négatif
Test ASCA-CHEK™ sur selles positif	28	5
Test ASCA-CHEK™ sur selles négatif	12	37

		Intervalles de confiance de 95%
Pourcentage d'Accord Positif	70%	53 - 83%
Pourcentage d'Accord Négatif	88%	74 - 96%
Pourcentage d'Accord Global	79%	70 - 86%

LIMITES DE LA PROCÉDURE

1. Les échantillons fécaux des patients suivants doivent être exclus du test ASCA-CHEK™ : patients présentant des antécédents de VIH et/ou d'Hépatite B et C, patients présentant une anamnèse de diarrhées infectieuses (au cours des 6 mois précédant le test), et patients ayant souffert d'une colostomie et/ou d'une iléostomie au cours du mois précédant le test.
2. Les dilutions d'échantillons de selles et de sérum recommandées par la notice ont été évaluées lors d'essais cliniques et se sont montrées optimales pour les résultats aux tests. Ainsi, seules les dilutions recommandées dans la notice doivent être appliquées.
3. Seuls les échantillons fécaux et sériques ont été cliniquement évalués à l'aide du test ASCA-CHEK™.
4. Les échantillons de selles conservés dans 10 % de formol, de formol thimérosal, de formol d'acétate de sodium, d'alcool polyvinylique ou contenant les restes d'un lavement baryté ne peuvent pas être utilisés. Les échantillons de sérum avec contamination microbienne ou ayant subi un traitement thermique ne doivent pas être testés.
5. Un test ASCA-CHEK™ positif indique la présence d'anticorps anti-*S. cerevisiae* et n'indique pas forcément la présence de la maladie de Crohn, en l'absence d'étude des antécédents cliniques et d'examen physique du patient.
6. Les échantillons provenant de patients souffrant de pathologies hépatiques chroniques et d'hypergammaglobulinémie n'ont pas été soumis au test ASCA-CHEK™ pour évaluer la présence potentielle d'ASCA dans les selles.
7. Il est possible d'obtenir des résultats divergents entre les mesures d'ASCA sanguin et dans les selles.

RÉACTIVITÉ CROISÉE DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

Différents organismes retrouvés dans les intestins ont été examinés afin de déceler une réactivité croisée dans le test ASCA-CHEK™. Pour l'analyse, des cultures de milieu ont été introduites dans un échantillon de selles négatif à l'ASCA et l'ensemble a été soumis à l'ASCA-CHEK™, conformément à la notice jointe. Parmi les organismes cités ci-dessous dans cette notice, aucun n'a réagi avec le test ASCA-CHEK™. Le test ASCA-CHEK™ n'a pas été soumis à réactivité croisée potentielle avec des entérovirus.

Aeromonas hydrophila

Bacillus cereus

Bacillus subtilis

Bacteroides fragilis

Campylobacter coli

Campylobacter jejuni

Candida albicans

Clostridium butyricum

Clostridium difficile (non-toxigenic) VPI 11186

Clostridium difficile (toxigenic) VPI 10463

Clostridium difficile (ToxA-/ToxB+) 8864

Clostridium perfringens Type A

Clostridium septicum

Clostridium sordellii

Clostridium sporogenes

Enterobacter cloacae

Escherichia coli EIEC SD67

Escherichia coli ETEC E2348169

Escherichia coli O157:H7

Escherichia coli

Helicobacter pylori

Klebsiella pneumoniae

Porphyromonas asaccharolytica

Proteus vulgaris

Pseudomonas aeruginosa

Salmonella typhimurium

Serratia liquefaciens

Shigella dysenteriae

Shigella flexneri

Shigella sonnei

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Streptococcus faecalis

Peptostreptococcus anaerobius

INTERFÉRENCES ANALYTIQUES POUR LE SÉRUM

Les substances suivantes présentes dans le sérum et pouvant potentiellement interférer avec le test ASCA-CHEK™ ont été testées. Chaque substance a été testée relativement aux interférences potentielles avec des échantillons de sérum positifs et négatifs pour les ASCA. Aucune interférence n'a été observée dans les échantillons de sérum testés. Le tableau 5 montre les concentrations et méthodes de mesure de chaque substance testée.

Tableau 5. Substances provoquant des interférences avec le test ASCA-CHEK™.

Substance testée	Méthode d'analyse	Concentrationsérique
Lipase	Hitachi 917	> 20 U/l
Cholestérol	Olympus AU5000	504 mg/dl
Sang hémolysé	Couleur rouge à l'oeil	Hémolysé
Facteur rhumatoïde	Néphélométrie	27,9 U/ml
Anticorps antinucléaires (ANA)	Néphélométrie	0,263 (ratio)
Bilirubine L (libre)	Beckman LX20	19 mg/dl
Bilirubine C (conjugée)	Beckman LX20	18 mg/dl

INCIDENCE DES ASCA SÉRIQUES DANS LES GROUPES HORS MALADIE DE CROHN

Les sérums des groupes hors maladie de Crohn ont été testés avec le test ASCA-CHEK™ et ont montré une fourchette de positivité de 4 à 13 %. Le tableau 6 montre les différents groupes de maladies avec le pourcentage de positifs correspondant. Les ASCA sériques peuvent aussi être dépistés chez les patients atteints d'autres pathologies auto-immunes (10).

Tableau 6. Incidence des ASCA sériques dans les groupes hors maladie de Crohn.

Groupe non associé à la maladie de Crohn	Nombre testé	Nombre de positifs	Pourcentage de positifs
Recto-colite hémorragique	46	6	13%
Syndrome du côlon irritable	30	3	10%
Constipation	1	0	0%
OEsophagite	1	0	0%
<i>H. pylori</i>	1	0	0%
Cirrhose alcoolique	20	1	5%
Positif aux ANA	3	0	0%
Sain	94	4	4%

REPRODUCTIBILITÉ ET PRÉCISION

La variation inter-essais pour les échantillons de selles a été déterminée en utilisant 8 échantillons de selles positifs aux ASCA et 4 négatifs aux ASCA, qui ont été testés trois fois sur une période de 6 jours. Pendant la période de test, tous les échantillons positifs sont restés positifs et tous les échantillons négatifs sont restés négatifs. La variation intra-essais a été déterminée en utilisant 18 échantillons de selles, 13 d'entre eux étant positifs à l'ASCA contre 5 négatifs, et chaque échantillon étant testé 8 fois par cycle. Pendant la période de test, tous les échantillons positifs sont restés positifs et tous les échantillons négatifs sont restés négatifs.

La variation inter-essais pour les échantillons de sérum a été déterminée en utilisant 4 échantillons de sérum positifs aux ASCA et 4 échantillons négatifs aux ASCA, qui ont été testés huit fois sur une période de 2 jours. Pendant la période de test, tous les échantillons positifs sont restés positifs et tous les échantillons négatifs sont restés négatifs. La variation intra-essais pour le sérum a été déterminée en utilisant 4 échantillons de sérum positifs aux ASCA et 4 échantillons négatifs, chaque échantillon étant testé 8 fois par cycle. Pendant la période de test, tous les échantillons positifs sont restés positifs et tous les échantillons négatifs sont restés négatifs.

REFERENCES CITED

1. Everhart, J.E. 1994. Digestive Diseases in the United States: Epidemiology and Impact. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. U.S. Government Printing Office. NIH Publication no. 94-1447.
2. Sartor, R.B. 1995. Microbial Agents in Pathogenesis, Differential Diagnosis, and Complications of Inflammatory Bowel Disease. In M. Blaser, P. Smith, J. Ravdin, H. Greenberg, and R. Guerrant (ed.), Infections of the Gastrointestinal Tract. Raven Press, New York, NY.
3. Annese, V., A. Andreoli, A. Andriulli, R.D. Inca, P. Gionchetti, A. Latiano, G. Lombardi, A. Piepoli, D. Poulain, and B. Sendid. 2001. Familial Expression of Anti-*Saccharomyces cerevisiae* Mannan Antibodies in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: A GISC Study. *Am. J. Gastroenterology* 96:2407-2412.
4. Dubinsky, M.C., J.J. Ofman, M. Urman, S. Targan, and E.G. Seidman. 2001. Clinical Utility of Serodiagnosis Testing in Suspected Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Gastroenterology* 96:758-765.
5. Peeters, M., S. Joossens, S. Vermeire, R. Vlietinck, X. Bossuyt and P. Rutgeerts. 2001. Diagnostic Value of Anti-*Saccharomyces cerevisiae* and Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies in Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Gastroenterology* 96:730-734.
6. Sandborn, W.J., E.V. Loftus, J.F. Colombel, K.A. Fleming, F. Seibold, H.A. Homburger, B. Sendid, R.W. Chapman, W. J. Tremaine, D.K. Kaul, J. Wallace, W.S. Harmsen, A.R. Zinsmeister, and S. Targan. 2001. Evaluation of Serologic Disease Markers in a Population Based Cohort of Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 7:192-201.
7. Boone, J., Sandborn, W., Pelanne, L., and D. Lyerly. 2002. Measurement of Anti-*Saccharomyces Cervisiae* Antibodies in Human Feces as an Indicator of Crohn's disease. Supplement to *Am. J. Gastroenterol.* 97:S253:771. Scientific presentation at the Annual Scientific Meeting of the American College of Gastroenterology.
8. Buderus, S., Ringelmann, H., Lentze, M., Boone, J., and D. Lyerly. 2003. Fecal Anti-*Saccharomyces* Antibodies (ASCA) – Evaluation of a New Diagnostic Test in Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD). Supplement to *Gastroenterology*. 124:A-196:S1327. Scientific presentation at Digestive Disease Week.
9. (www.niddk.nih.gov/health/digest/pubs/crohns/crohns.htm).
10. Muratori P, Muratori L, *et al.* Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) and autoimmune liver diseases. *Clin Exp Immunol* 2003; 132:473-476.

Technical Support

Further information can be obtained by contacting TECHLAB® Technical Support:

US	+ 1 800 TECHLAB
Phone	(540) 953-1664
Fax	(540) 953-1665
Email	ts@techlab.com

© 2023 TECHLAB, Inc. All rights reserved.

ASCA-CHEK, the TECHLAB Logo and TECHLAB are trademarks of TECHLAB, Inc.