



COD 44872 96 Determinaciones
CONSERVAR A 2-8°C
Reactivos para la determinación de ASCA Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico

ASCA-IgG/IgA

Enzimoimmunoensayo
PRUEBA EN MICROPLACA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) presentes en el suero se unen al antígeno adsorbido a la superficie de los pocillos de la microplaca. A continuación, se incuba con anticuerpos anti-IgG o anti-IgA humanas conjugados con peroxidasa. Finalmente, se añade el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de H₂O₂, que al ser degradado por la peroxidasa da lugar a un producto de color azul. La reacción enzimática se detiene con una solución de ácido clorhídrico y la formación de producto amarillo se mide a 450 nm. La concentración de anticuerpos en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto de la reacción¹.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- A. Tampón de Lavado Concentrado.** 50 mL. Tampón fosfatos, azida de sodio 15 mmol/L.
- B. Diluyente de Muestra.** 100 mL. Tampón Tris, azida de sodio 15 mmol/L.
- C+. Control Positivo IgG/IgA.** 1,5 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos ASCA tipo IgG e IgA, azida de sodio 15 mmol/L.
- C-. Control Negativo.** 1,5 mL. Listo para su uso. Suero humano negativo para anticuerpos ASCA, azida de sodio 15 mmol/L.
- DG. Conjugado IgG.** 15 mL. Inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-IgG humana conjugadas con peroxidasa.
- DA. Conjugado IgA.** 15 mL. Inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-IgA humana conjugadas con peroxidasa.
- E. Sustrato.** 15 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- F. Solución de Paro.** 15 mL. Ácido clorhídrico 1,0 mol/L.
- M. Microplaca:** 12 módulos de 8 pocillos cada uno sensibilizados con mananos de *Saccharomyces cerevisiae* altamente purificados.
- S1-S6. Patrones ASCA IgG/IgA.** 1,5 mL, listos para su uso. Suero con anticuerpos ASCA IgG e IgA, azida de sodio 15 mmol/L. Las concentraciones de ASCA IgG son 0, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 U/mL, según se indica en la etiqueta. Las concentraciones de ASCA IgA son 0, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 U/mL, según se indica en la etiqueta. Calibrados frente a un Patrón de Referencia Interno.

Los sueros humanos utilizados en la preparación de los patrones, del control negativo y el control positivo eran negativos para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, los patrones y los controles deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

Los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit sin empezar, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso. Una vez abiertos, se recomienda utilizar los componentes antes de 4 semanas.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivos: Presencia de partículas, turbidez.
- Microplaca: Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras en la base del pocillo.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Tampón de lavado. Efectuar una dilución 1/20 del Tampón de Lavado Concentrado (A) con agua destilada y mezclar. Se necesitan aproximadamente 50 mL de Tampón de Lavado para el lavado de una tira. Una vez diluido, el reactivo es estable 30 días a 2-8°C.

Los demás componentes están listos para su uso.

EQUIPO ADICIONAL

- Cámara húmeda.
- Aspirador multicanal o lavador automático de microplacas.
- Lector de microplacas o fotómetro con microcubeta y filtro de 450 ± 10 nm.

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. Diluir las muestras 1/100 con Diluyente de Muestra antes del ensayo. Utilizar siempre diluciones frescas.

PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los componentes del kit a temperatura ambiente (Nota 1).
2. Abrir la bolsa de la microplaca (M) y retirar la cantidad necesaria de pocillos (Nota 2).
3. **Determinación cuantitativa:** Pipetear 100 µL de cada uno de los Patrones IgG/IgA (S1-S6), Control Positivo IgG/IgA (C+), Control Negativo (C-) y muestras diluidas en distintos pocillos.
Determinación cualitativa: Pipetear 100 µL de Patrón S3 IgG/IgA, Control Positivo IgG/IgA (C+), Control Negativo (C-) y muestras diluidas en distintos pocillos. Pipetear 100 µL de Diluyente de Muestra para el blanco.
4. Incubar los pocillos durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
5. Aspirar el líquido y lavar los pocillos con 300 µL de Tampón de Lavado durante unos 10 segundos 3 veces (Notas 3 y 4).
6. Pipetear 100 µL de Conjugado IgG (DG) o Conjugado IgA (DA) en cada uno de los pocillos.
7. Incubar los pocillos durante 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
8. Lavar como en el paso 5.
9. Pipetear 100 µL de Sustrato (E) en cada uno de los pocillos.
10. Incubar los pocillos durante 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
11. Pipetear 100 µL de Solución de Paro (F) en cada uno de los pocillos e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (Nota 5).
12. Medir la absorbancia del contenido de cada pocillo a 450 nm usando el Patrón S1 o el blanco para el ajuste a 0. El color es estable durante al menos 30 minutos.

CÁLCULOS

Determinación cuantitativa. Representar gráficamente los valores de absorbancia obtenidos para los Patrones frente a sus respectivas concentraciones de anticuerpos ASCA (IgG o IgA, en U/mL). La concentración de anticuerpos en la muestra se calcula por interpolación de la absorbancia en la curva de calibración.

Determinación cualitativa. Calcular la absorbancia del Valor Discriminante aplicando la siguiente fórmula:

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Valor Discriminante} = A_{450 \text{ nm}} \text{ S3} \times F$$

El valor F es 0,8 tanto para IgG como para IgA, y relaciona S3 con el valor discriminante teórico de la prueba.

Calcular la razón de absorbancias aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Razón de absorbancia} = \frac{A_{450 \text{ nm}} \text{ de la Muestra}}{A_{450 \text{ nm}} \text{ del Valor Discriminante}}$$

Cuando se obtengan valores de absorbancia por encima del límite superior del rango del lector de microplacas, diluir la muestra con Diluyente de Muestra y repetir la operación.

VALORES DE REFERENCIA

Se consideran positivas las muestras con concentraciones superiores a 10 U/mL, o con razón de absorbancia superior a 1,0, tanto para IgG como para IgA.

Se consideran negativas las muestras con concentraciones inferiores a 10 U/mL, o con razón de absorbancia inferior a 1,0, tanto para IgG como para IgA.

Estos valores se dan únicamente a título orientativo. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CONTROL DE CALIDAD

El valor de absorbancia del blanco debe ser inferior a 0,150, tanto para IgG como para IgA.

El valor de absorbancia del Patrón S6 debe ser superior a 1,300, tanto para IgG como para IgA.

La concentración del Control Positivo (C+) debe quedar comprendida entre 30 U/mL y 50 U/mL, y la del Control Negativo (C-) debe ser inferior a 10 U/mL, tanto para IgG como para IgA.

La razón de absorbancia para el Control Negativo (C-) debe ser inferior a 1,0, tanto para IgG como para IgA.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

– Repetibilidad (intra):

ASCA (IgG)			ASCA (IgA)		
U/mL	U/mL	U/mL	U/mL	CV%	n
9,6	4,3	9	5,1	5,2	9
19,3	6,6	9	26,8	6,5	9
76,5	8,8	9	66,4	6,1	9

– Reproducibilidad (inter):

ASCA (IgG)			ASCA (IgA)		
U/mL	CV %	n	U/mL	CV%	n
10,5	7,1	24	5,9	6,6	24
31,2	3,8	24	29,1	6,0	24
67,3	7,5	24	81,2	6,4	24

- Límite de Detección: 1,0 U/mL, tanto para IgG como para IgA.
- El kit ASCA IgG/IgA reconoce solamente autoanticuerpos específicos de mananos de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Interferencias: La hemólisis (hemoglobina < 1000 mg/dL), la lipemia (triglicéridos < 3000 mg/dL) y la bilirrubina (< 40 mg/dL) no interfieren. Otras sustancias y medicamentos pueden interferir².
- Intervalo de medida: 3,0–100 U/mL, tanto para IgG como para IgA. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra con Diluyente de Muestra y repetir la medición.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La detección de anticuerpos ASCA es útil para el diagnóstico de enfermedad inflamatoria del intestino, especialmente para diferenciar entre la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, en particular colitis indeterminada, utilizando una combinación de pruebas con anticuerpos anti-neutrófilo citoplasmático perinuclear (pANCA) y ASCA³. Los anticuerpos ASCA tienen una fuerte correlación con la enfermedad de Crohn³. Tanto los isotipos IgG como IgA se encuentran con mayor frecuencia en pacientes de enfermedad de Crohn (50%-80%) que en pacientes con colitis ulcerativa (2%-14%) o en individuo sanos (1%-7%)⁴. Aproximadamente dos tercios de los pacientes de enfermedad de Crohn con ASCA IgG también son positivos para ASCA IgA, pero solamente el 0%-19% de los pacientes tienen solamente anticuerpos del isotipo IgA. En enfermos de Crohn, la especificidad llega hasta el 90% en aquellos casos que son positivos para ASCA IgG e IgA, especialmente cuando la concentración de los anticuerpos de ambos isotipos es alta⁵. La sensibilidad para anticuerpos ASCA varía entre el 41%-76%⁶.

Los niveles de anticuerpos ASCA IgG e IgA en pacientes con enfermedad de Crohn son muy variables⁵. La prevalencia de anticuerpos ASCA es mucho mayor en casos de enfermedad de Crohn esporádica y en familias únicamente con enfermedad de Crohn (63%), comparado con familias con enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa presentes al mismo tiempo⁵.

La sensibilidad y especificidad para la enfermedad de Crohn del kit de Anticuerpos ASCA IgG de BioSystems fue del 75,0% y 96,2%, respectivamente, en un estudio con 257 muestras clínicas. Para el isotipo IgA, la sensibilidad fue del 62,5% y la especificidad fue del 95,7%, en un estudio con 257 muestras clínicas. Los detalles de los estudios están disponibles bajo solicitud.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. No mezclar componentes de distintos lotes de kit.
2. Guardar los pocillos que no se utilicen en la bolsa bien cerrada y con el saquito desecante en su interior.
3. Tener cuidado de no rayar la superficie interior de los pocillos durante todo el procedimiento.
4. Es importante que no queden restos de Tampón de Lavado en los pocillos.
5. La Solución de Paro (F) detiene la reacción enzimática, por lo que se debe pipetear en los pocillos siguiendo el mismo orden y a los mismos intervalos de tiempo con que se inició la reacción pipeteando el Sustrato (E) en el paso 9.

BIBLIOGRAFÍA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.
3. Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthileul P, Cortot A, Grandbastien B, Charrier G, Targan SR, Colombel JF, Poulain D. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. Gut 1998; 42: 788-791.
4. Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P. Diagnostic value of anti-*Saccharomyces cerevisiae* and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2001; 96: 730-734.
5. Norman GL. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in inflammatory bowel disease. Clin Applied Immunol Rev 2001; 2: 45-63.
6. Vermeire S, Joossens S, Peeters M, Monsuur F, Marien G, Bossuyt X, Groenen P, Vlietinck R, Rutgeerts P. Comparative study of ASCA (Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody) assays in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2001; 120: 827-833.