



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 



ImmuGlo™

Anti-Exocrine Pancreas Antibody (ExPA) Test System



For *in vitro* diagnostic use



1194 40 Determinations

INTENDED USE

An indirect immunofluorescence test for the detection and semi-quantitation of exocrine pancreas antibodies in human serum to aid in the diagnosis of *Crohn's Disease (CD)*.

SUMMARY AND EXPLANATION

Crohn's Disease (CD) and ulcerative colitis (UC), collectively known as inflammatory bowel disease (IBD), are relatively common chronic inflammations of the gastrointestinal (GI) tract. Even though they are histopathologically and anatomically distinct, they have many common symptoms and are hard to differentiate. Because the treatment and prognosis are different for the two conditions, it is important to identify serological markers highly specific for CD and UC, respectively¹.

Exocrine pancreas autoantibodies (ExPA) have been suggested as a very specific Crohn's Disease serological marker. Clinical studies reported a prevalence of 30-50 % in CD patients²⁻¹¹. In spite of the relatively low sensitivity, ExPA detects a subpopulation of CD patients that are negative for other CD markers (ASCA IgG, ASCA IgA), thus being very useful in combination with other IBD tests.

ExPA are circulating antibodies that react with secretory granules in the cytoplasm of exocrine pancreas cells and their presence was not detected in normal individuals or in patients suffering from UC or other GI inflammations.

Significantly, ExPA were not only detected in CD patients but also in healthy first-degree relatives of CD patients that display a significantly increased risk of developing the disease⁴. Thus, ExPA testing may also have prognostic value for CD susceptibility.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

Exocrine pancreas antibodies are detected by indirect immunofluorescence (IF). In this method, patients' sera are incubated on sections of monkey pancreas to allow binding of antibodies to the tissue substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of these sections with a fluorescein-labeled conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters.

The presence of exocrine pancreas antibodies (ExPA) is demonstrated by a specific apple green reticulo-granular fluorescence pattern in the cytoplasm of the exocrine pancreas cells. The cytoplasm of the endocrine cells located in the islets of Langerhans does not present this staining pattern. The titer (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) is then determined by testing serial dilutions of patient sera¹².

EN REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Reagents are stable until the expiration date when stored and handled as directed.

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use.

Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date.

Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious.⁷ Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials.

WARNING - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. NaN₃ is toxic if ingested. Report incidents immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.

Materials provided

[REF] 1194 Exocrine Pancreas Antibody Test

Kits contains sufficient reagents to perform 40 determinations.

10 x	[SORB SLD 4]	4 well monkey pancreas substrate slide
1 x 0.5ml	[CONTROL + EXPA]*	Ready to use Positive Control . Contains human serum positive for exocrine pancreas antibodies.
1 x 0.5ml	[CONTROL -]*	Ready to use Negative Control . Contains human serum.
1 x 5ml	[IgG-CONJ FITC EB]*	Anti-human IgG FITC Conjugate containing Evan's Blue. Protect from light.
1 x 60 ml	[BUF]*	Buffered Diluent . Ready for use.
2 x vials	[BUF WASH]	Phosphate Buffered Saline. Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.
1 x 5ml	[MOUNTING MEDIUM]*	Mounting Medium . Do not freeze.
12 x	[COVER SLD]	Coverslips
1 x		Report form

Optional Components

1 x 5ml	[IgG-CONJ FITC]*	[REF] 2099X Anti-human IgG FITC Conjugate . Protect from light.
1 x 1ml	[EVANS]*	[REF] 2510 Evans Blue Counterstain

* Contains <0.1% NaN₃

Symbols used on labels

[LOT] Lot number



Catalog number



In vitro diagnostic use



Use by



Storage temperature



Read instructions before use



Number of tests



Manufacturer

Materials Required But Not Provided

- Fluorescence microscope
- Micropipette or Pasteur pipette
- Serological pipettes
- Staining dish (e.g. Coplin jar)
- Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack
- Distilled or deionized water
- 1 liter container
- Wash bottle
- Absorbent paper towels
- Incubation chamber

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples. It is recommended that frozen specimens be tested within one year.

PROCEDURE

Test Method

A. Screening:

- Step 1.** Dilute each patient serum **1:5** with the Buffered Diluent provided (0.1 ml serum + 0.4 ml diluent). Screening at more than one dilution helps to avoid a “prozone phenomenon.” For screening, **DO NOT dilute the Positive or Negative Controls**. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
- Step 2** Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for **10-15 minutes**. Carefully remove the slides from their pouch without touching the substrate.
- Step 3** Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
- Step 4** Using a micropipette or Pasteur pipette, apply **1 drop** (approximately 50 µl) of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of Positive Control to well #2. Avoid overfilling the wells.
- Step 5** Using a micropipette or Pasteur pipette, apply **1 drop** of patient’s diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.

- Step 6** Place the lid on the incubation chamber and incubate slides **1 hour at room temperature**.
- Step 7** Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately **10 ml** of PBS using a pipette, or rinse slide in a beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides.
- Step 8** Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the **goat anti-human IgG FITC conjugate** dropper vial and gently squeeze to apply **1 drop** (approximately 50 µl) to each well. Repeat process with all remaining slides.
- Step 9** Replace the lid on the incubation chamber. Incubate **30 minutes** at room temperature.
- Step 10** Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides. **NOTE:** Improper washing may lead to increased background fluorescence.
- Step 11** Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **While slide is still wet mount the coverslip.** Place **3 drops** of the Mounting Medium evenly spaced on a coverslip and invert the slide onto the coverslip. To remove any air bubbles gently apply pressure along the edge of the coverslip. Avoid any movement of the coverslip. Repeat process with all remaining slides.
- Step 12** Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of **200x** or greater.

Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of an anti-fading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed. Slides should be stored in the dark at 2°- 8°C.

B: End Point Determination (Titration)

Serum found positive in the screening test may be further tested to determine the titer by following **Steps 5 through 12**. Each test run should include the undiluted Negative Control and **undiluted, 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16** dilutions of the Positive Control. Serial two-fold dilutions of the patient's serum should be made as well starting at **1:5**. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

Preparation of Serial Dilutions

For each serum positive for exocrine pancreas antibodies upon screening, number four tubes 1 to 4 and add **0.4 ml** of Buffered Diluent to tube 1 and **0.2 ml** to subsequent tubes. Pipette **0.1 ml** of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer **0.2 ml** from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring **0.2 ml** from one tube to the next after mixing to yield the expected dilutions as depicted in the following table:

EN Tubes	1	2	3	4
Serum	0.1 ml +			
Buffered Diluent	0.4 ml	0.2 ml ↗	0.2 ml ↗	0.2 ml ↗
Transfer		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Final dilution	1:5	1:10	1:20	1:40

Quality Control

Both a positive and negative control serum should be included with each test run. The negative control should show no significant fluorescence in the cytoplasm of the pancreas cells. The positive control should stain the cytoplasm of the exocrine pancreas cells but not the one of islet cells. Upon titration of the positive control, an endpoint titer of $\pm$ doubling dilution from the indicated titer should be obtained. If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control.
- Problems with the optical system of the fluorescence microscope. These may include: improper alignment, use of the bulb beyond the expected performance life, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.
- Improper preparation of serial dilutions of control.

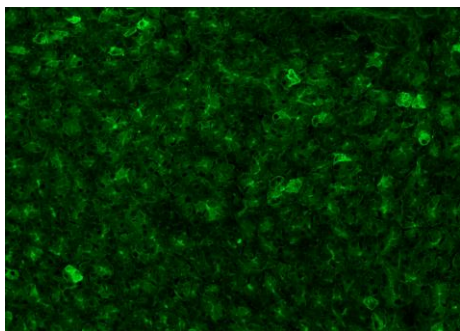
RESULTS

The results of the tests for islet cell antibodies should be reported as negative (<5) or positive with titer of 5 or higher.

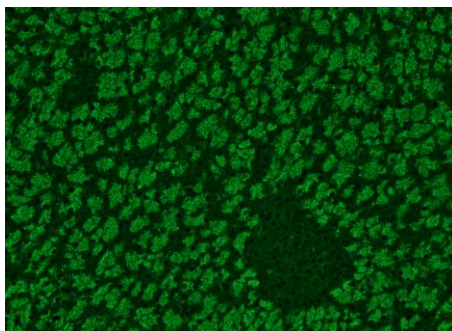
Read for specific staining of the cytoplasm of exocrine pancreas cells (Figure 1). Various other tissue antibodies such as antinuclear antibodies (ANA), mitochondrial antibodies, islet cell (endocrine pancreas) antibodies, and smooth muscle antibodies may also be observed on pancreas sections. Sera giving any of these reactions should be reported as negative for antibodies to exocrine pancreas. Any sera giving nuclear staining reactions may be tested with the Antinuclear Antibody (ANA) Test (HEp-2 Cells) or the Antinuclear Antibody (ANA) Test (Mouse Liver Sections). Any sera giving smooth muscle or mitochondrial staining reactions may be tested with the Autoantibody Test System (Mouse Kidney/Stomach Sections). Any sera giving cytoplasmic islet cell staining may be additionally tested with Islet Cell Antibody (ICAb) Test System.

Figure 1. Florescence microscopy staining patterns obtained with a normal control serum (left) and with an ExPA positive CD patient sera.

ExPA negative staining reaction



ExPA positive staining pattern (CD)



LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Occasionally sera may exhibit strong staining for ANA or other autoantibodies. These may interfere with the ability to detect exocrine pancreas antibodies. In such cases, titrating the serum may permit the visualization of the exocrine pancreas antibodies. In other cases their titer may be lower than the ANA or other antibodies and hence may not be detected. The ImmuGlo™ exocrine pancreas antibody test should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only.

EXPECTED VALUES

The incidence of exocrine pancreas antibodies in IBD patients and normal individuals has been studied by various investigators. The incidence of ExPA in Crohn's disease was found to be between 30% and 50% (see Table 1)²⁻¹¹. The majority of clinical studies found ExPA to be highly specific for Crohn's disease, especially at higher titers. Few studies reported an ExPA association with particular subtypes of CD. For example, Koutrobakis et al. reported that 60% of the stenotic CD patients tested were ExPA positive⁵. The incidence of ExPA also varies with patient ethnicity and age. A recent study reported a higher incidence in Chinese CD patients (46%) compared to Australian Caucasian CD patients (22%)². When these results were sub-classified on age groups, the incidence of ExPA in Chinese CD patients under 35 was even higher (67%).

In an in-house small-scale study on 25 CD patients, 25 UC patients and 25 normal controls, we found that 56% of the CD patients were ExPA positive, while all UC patients and normal controls were ExPA negative. We tested the CD and UC patient sera for other IBD markers (pANCA, ASCA IgG, ASCA IgA) and we found that ExPA testing was able to detect a subpopulation of CD patients that were ASCA negative (Figure 2). Thus, when combining the ExPA results with ASCA testing, the sensitivity of the assay was increased from 52% to 76%, stressing the importance of testing multiple markers for an accurate distinction between UC and CD (Table 2).

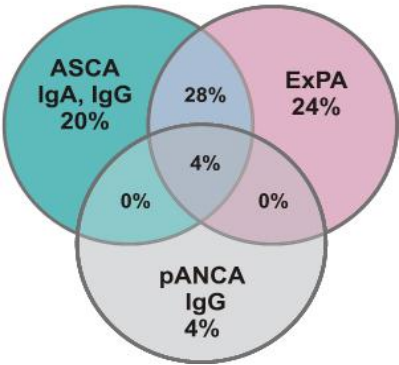
Table 1. Incidence of exocrine pancreas antibodies in Crohn’s Disease patients.

Study	Number of CD Patients	% Positive
Lawrance et al. 2005	50 Chinese Hong Kong	46
	50 Australian Caucasian	22
Klebl et al. 2005	208	29
Joossens et al. 2004	169	32
Koutroubakis et al. 2005	77	42
Seibold et al. 1991	222	31
Stocker et al. 1987	59	39
Folwaczny et al. 1998	76	38
Seibold et al. 1997	212	27
IMMCO Diagnostics study 2006	25	56

Table 2. Sensitivity and specificity of various IBD markers in the IMMCO Diagnostics study.

IBD Marker	Sensitivity (%)	Specificity (%)
pANCA for UC	52	92
ExPA for CD	56	100
ASCA for CD	52	92
ExPA + ASCA for CD	76	92

Figure 2. Prevalence of IBD markers in Crohn’s disease patients (IMMCO Diagnostics study, n=25).





ImmuGlo™

Test per gli anticorpi anti-pancreas esocrino (ExPA)

IVD

Per uso diagnostico *in vitro*

REF

1194

40 determinazioni

USO PREVISTO

Test di immunofluorescenza indiretta per il rilevamento e la determinazione semiquantitativa degli anticorpi diretti contro il pancreas esocrino nel siero umano, come ausilio nella diagnosi della *malattia di Crohn (CD)*.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

La malattia di Crohn (CD) e la colite ulcerosa (UC), note nel loro insieme come malattia infiammatoria intestinale (IBD), sono infiammazioni croniche relativamente comuni del tratto gastrointestinale (GI). Anche se differenti dal punto di vista istopatologico e anatomico, hanno molti sintomi comuni e sono difficili da differenziare. Dato che il trattamento e la prognosi per le due condizioni sono diversi, è importante identificare marcatori sierologici fortemente specifici per la CD e la UC, rispettivamente¹.

È stato suggerito che gli autoanticorpi anti-pancreas esocrino (ExPA - EXocrine Pancreas Autoantibodies) siano un marcatore sierologico molto specifico per la malattia di Crohn. Gli studi clinici hanno riportato una prevalenza del 30-50 % nei pazienti con CD²⁻¹¹. Nonostante la sensibilità relativamente bassa, gli ExPA permettono di rilevare una sottopopolazione di pazienti con CD che sono negativi per altri marcatori di CD (IgG e IgA ASCA) e ciò li rende molto utili in combinazione con altri test per la IBD.

Gli ExPA sono anticorpi circolanti che reagiscono con i granuli secretori nel citoplasma delle cellule pancreatiche esocrine e la loro presenza non è stata rilevata nei soggetti normali o nei pazienti affetti da UC o altre infiammazioni GI.

È significativo che gli ExPA non sono stati rilevati solo nei pazienti con CD, ma anche nei loro parenti di primo grado sani che mostrano un rischio significativamente aumentato di sviluppo della malattia⁴. I test ExPA possono quindi avere anche un valore prognostico per la sensibilità alla CD.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Gli anticorpi anti-pancreas esocrino vengono rilevati mediante immunofluorescenza indiretta (IFI). In questo metodo, i sieri del paziente vengono incubati su sezioni di pancreas di primati per consentire il legame degli anticorpi al substrato tissutale. Tutti gli anticorpi non legati vengono rimossi mediante risciacquo. Gli anticorpi legati della classe IgG vengono rilevati incubando queste sezioni con un coniugato marcato con fluorescina. Le reazioni vengono osservate con un microscopio a fluorescenza dotato di filtri appropriati.

La presenza degli anticorpi pancreatici esocrini (*ExPA*) viene dimostrata dalla presenza di uno specifico schema di fluorescenza reticolo-granulosa color verde mela nel citoplasma delle cellule pancreatiche esocrine. Il citoplasma delle cellule endocrine situato negli

IT

isolotti di Langerhans non presenta questo schema di colorazione. Il titolo (cioè, il reciproco della massima diluizione che fornisce una reazione positiva) viene determinato testando diluizioni seriali dei sieri del paziente¹².

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. **Non congelare.** I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza, quando conservati e maneggiati secondo le indicazioni.

Non utilizzare se il reagente non è limpido o in presenza di un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'uso.

Ricostituire il tampone di lavaggio a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Quando conservato a 2-8 °C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana utilizzati sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 e HTLV-I, risultando negativi in base ai test richiesti dalla FDA. Gli emoderivati umani e i campioni dei pazienti vanno tuttavia considerati potenzialmente infettivi. Seguire le buone pratiche di laboratorio durante la conservazione, la preparazione, la distribuzione e lo smaltimento di questi materiali.⁷

AVVERTENZA: il sodio azide (NaN_3) può reagire con le tubazioni di piombo e rame formando azidi metalliche estremamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, far scorrere abbondante acqua per prevenire l'accumulo di azidi. Il NaN_3 è tossico se ingerito. Riferire immediatamente ogni incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati, seguire le istruzioni esattamente come appaiono nel presente foglio illustrativo del kit. Non scambiare i componenti del kit con quelli di altre fonti. Seguire le buone pratiche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza segnata sulle etichette.

Materiali forniti

REF 1194 Test per gli anticorpi anti-pancreas esocrino

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 40 determinazioni.

10 x	[SORB SLD 4]	Vetrino a 4 pozzetti con substrato di pancreas di primati
1 x 0.5ml	[CONTROL+ EXPA]*	Controllo positivo pronto per l'uso. Contiene siero umano positivo per gli anticorpi anti-pancreas esocrino.
1 x 0.5ml	[CONTROL-]*	Controllo negativo pronto per l'uso. Contiene siero umano.
1 x 5ml	[IgG-CONJ FITC EB]*	Coniugato FITC anti-IgG umane contenente blu di Evan. Proteggere dalla luce.
1 x 60 ml	[BUF]*	Diluente tamponato. Pronto per l'uso.
2 flacone	[BUF WASH]	Tampone fosfato isototonico. Tampone di lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.
1 x 5ml	[MOUNTING MEDIUM]*	Mezzo di montaggio. Non congelare.
12 x	[COVER SLD]	Vetrini coprioggetti.
1 x		Modulo di refertazione.

Componenti facoltativi1 x 5ml **IgG-CONJ|FITC*****REF** 2099X **Coniugato FITC anti-IgG umana.**
Proteggere dalla luce.1 x 1ml **EVANS*****REF** 2510 **Colorazione di contrasto blu di Evans*** Contiene <0.1% di NaN₃**Simboli utilizzati sulle etichette**

Codice del lotto



Numero di catalogo

Per uso diagnostico *in vitro*

Utilizzare entro



Temperatura di conservazione



Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso



Numero di test



Fabbricante

Materiali necessari ma non forniti

- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta di Pasteur
- Pipette per sierologia
- Vaschetta per colorazione (ad es. vaso di Coplin)
- Provette piccole (ad es. 13 x 75 mm) e rastrelliera per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro
- Boccetta di lavaggio
- Salviette di carta assorbente.
- Camera di incubazione

PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare solo campioni di siero. I campioni che mostrano emolisi macroscopica, lipemia o contaminazione microbica possono interferire con le prestazioni del test e non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a 2-8 °C per una settimana al massimo. Per conservazioni più prolungate, congelare i campioni di siero. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni. Si raccomanda di analizzare i campioni congelati entro un anno.

PROCEDURA**Metodo del test****A. Screening:**

Passaggio 1 Diluire ogni siero del paziente **1:5** con il diluente tamponato fornito (0,1 ml di siero + 0,4 ml di diluente). Eseguire lo screening a più diluizioni aiuta a evitare il “fenomeno di prozona”. Per lo screening, **NON diluire i controlli**

- positivo o negativo.** Mettere da parte i sieri non diluiti per determinare i titoli anticorpali se i test di screening sono risultati positivi.
- Passaggio 2** Lasciar equilibrare a temperatura ambiente per **10-15 minuti** le buste contenenti i vetrini con il substrato. Rimuovere con cautela i vetrini dalle loro buste senza toccare il substrato.
- Passaggio 3** Etichettare i vetrini e inserirli in camera di incubazione allineati con salviette di carta assorbente inumidite con acqua per prevenire l'essiccazione.
- Passaggio 4** Utilizzando una micropipetta o una pipetta di Pasteur, applicare **1 goccia** (circa 50 µl) del controllo negativo al pozzetto n.1. Analogamente, applicare 1 goccia del controllo positivo al pozzetto n. 2. Non riempire eccessivamente i pozzetti.
- Passaggio 5** Utilizzando una micropipetta o una pipetta di Pasteur, applicare **1 goccia** di siero diluito del paziente (circa 50 µl) agli altri pozzetti. Non riempire eccessivamente i pozzetti.
- Passaggio 6** Mettere il coperchio sulla camera di incubazione e incubare i vetrini per **1 ora a temperatura ambiente.**
- Passaggio 7** Rimuovere un vetrino dalla camera di incubazione. Impugnare il vetrino tenendolo per l'estremità a linguetta e risciacquare delicatamente con circa **10 ml** di PBS utilizzando una pipetta oppure risciacquare il vetrino in un becher pieno di PBS. Non utilizzare la boccetta di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino nel vaso di Coplin e lavare per **10 minuti**. Ripetere il processo con tutti i vetrini restanti.
- Passaggio 8** Rimuovere i vetrini dal vaso di Coplin. Tamponare il bordo del vetrino su una salvietta di carta assorbente per rimuovere il PBS in eccesso. Collocare immediatamente il vetrino nella camera di incubazione. Capovolgere immediatamente il flacone contagocce del **coniugato FITC anti-IgG umane di montone** e comprimerlo delicatamente per applicare **1 goccia** (circa 50 µl) a ogni pozzetto. Ripetere il processo con tutti i vetrini restanti.
- Passaggio 9** Rimettere il coperchio sulla camera di incubazione. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
- Passaggio 10** Rimuovere un vetrino dall'incubatore. Impugnare il vetrino tenendolo per l'estremità a linguetta e immergerlo in un becher contenente PBS per rimuovere il coniugato in eccesso. Collocare i vetrini in una vaschetta per colorazione piena di PBS per **10 minuti**. Ripetere il processo con tutti i vetrini restanti. **NOTA:** il lavaggio non appropriato può aumentare la fluorescenza di sfondo.
- Passaggio 11** Rimuovere un vetrino dalla vaschetta per colorazione. Tamponare il bordo del vetrino su una salvietta di carta assorbente per rimuovere il PBS in eccesso. **Montare il vetrino coprioggetti mentre il vetrino è ancora umido.** Mettere **3 gocce** del mezzo di montaggio distribuito uniformemente su un vetrino coprioggetti e capovolgere su di esso il vetrino. Per rimuovere tutte le bolle d'aria, applicare una leggera pressione lungo il bordo del vetrino coprioggetti. Evitare qualsiasi movimento di quest'ultimo. Ripetere il processo con tutti i vetrini restanti.
- Passaggio 12** Cercare la fluorescenza specifica con un microscopio a fluorescenza e un ingrandimento di **200 x** o superiore.

I vetrini possono essere letti non appena preparati. Tuttavia, data la presenza di un agente antiscolorimento nel mezzo di montaggio, non si ha alcuna perdita significativa nell'intensità di colorazione se la lettura viene ritardata. I vetrini devono essere conservati al buio a 2-8 °C.

B. Determinazione dell'endpoint (titolazione)

Un siero risultato positivo al test di screening può essere analizzato ulteriormente per determinare il titolo seguendo i **passaggi da 5 a 12**. Ogni esecuzione del test deve includere il controllo negativo non diluito, il controllo positivo **non diluito** e le diluizioni **1:2, 1:4, 1:8 e 1:16** del controllo positivo. Eseguire anche diluizioni duplici seriali del siero del paziente iniziando da **1:5**. Il titolo è il reciproco della massima diluizione che produce una reazione positiva.

Preparazione delle diluizioni seriali

Per ogni siero positivo allo screening per gli anticorpi anti-pancreas esocrino, numerare quattro provette da 1 a 4 e aggiungere **0,4 ml** di diluente tamponato alla provetta 1 e **0,2 ml** alle provette successive. Pipettare **0,1 ml** di siero non diluito nella provetta 1 e miscelare accuratamente. Trasferire **0,2 ml** dalla provetta 1 alla provetta 2 e miscelare accuratamente. Continuare a trasferire **0,2 ml** da una provetta a quella successiva dopo la miscelazione per produrre le diluizioni previste come indicato nella seguente tabella:

Provette	1	2	3	4
Siero	0.1 ml			
	+			
Diluente tamponato	0.4 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↗	↗	↗ ↗
Trasferimento		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluizione finale	1:5	1:10	1:20	1:40

Controllo di qualità

Ogni esecuzione del test deve includere, sia un siero di controllo positivo, sia un siero di controllo negativo. Il controllo negativo non deve mostrare una fluorescenza significativa nel citoplasma delle cellule pancreatiche. Il controllo positivo deve colorare il citoplasma delle cellule pancreatiche esocrine, ma non quello delle cellule insulari. Alla titolazione del controllo positivo, ottenere dal titolo indicato un titolo dell'endpoint a una diluizione $\pm$ doppia. Se non vengono ottenuti i risultati previsti, il test deve essere ripetuto. Se persistono risultati inadeguati con i controlli, ciò può essere dovuto a:

- Torbidità. Gettare il controllo e utilizzarne un altro.
- Problemi con il sistema ottico del microscopio a fluorescenza. Questi possono includere: allineamento scorretto, utilizzo della lampadina oltre la durata utile prevista, eccetera.
- Vetrino lasciato asciugare durante la procedura.
- Preparazione scorretta delle diluizioni seriali del controllo.

RISULTATI

I risultati dei test per gli anticorpi anti-cellule insulari vanno refertati come negativi (<5) o positivi in presenza di un titolo pari a 5 o superiore.

Leggere la colorazione specifica del citoplasma delle cellule pancreatiche esocrine (Figura 1). Sulle sezioni pancreatiche si possono osservare anche vari altri anticorpi tissutali come ad esempio gli anticorpi antinucleari (ANA), gli anticorpi anti-mitocondriali, gli anticorpi anti-cellule insulari (pancreas endocrino) e gli anticorpi anti-muscolatura liscia. I sieri che forniscono una qualsiasi di queste reazioni vanno refertati come negativi per gli

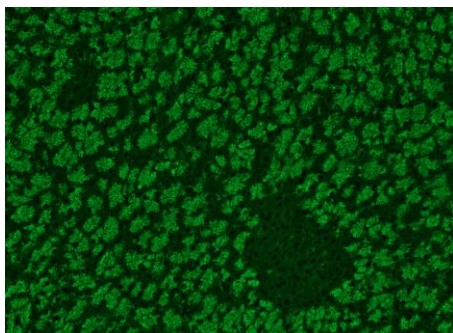
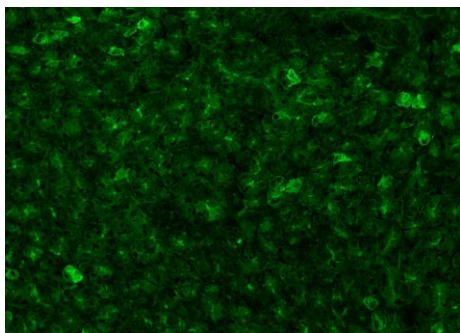
IT

anticorpi anti-pancreas esocrino. Tutti i sieri che forniscono reazioni di colorazione nucleare, possono essere sottoposti al test per gli anticorpi antinucleari (ANA) su cellule HEp-2 o al test ANA su sezioni di fegato murino. Tutti i sieri che forniscono reazioni di colorazione della muscolatura liscia o dei mitocondri possono essere sottoposti al test per gli autoanticorpi (su sezioni di rene o di stomaco murino). Tutti i sieri che forniscono una colorazione citoplasmatica delle cellule insulari possono essere ulteriormente sottoposti al test degli autoanticorpi anti-cellule insulari (ICAb).

Figura 1. Schemi di colorazione con microscopia a fluorescenza ottenuti con un siero di controllo normale (sinistra) e sieri di pazienti con CD positivi per gli ExPA.

Reazione di colorazione negativa per gli ExPA

Schema di colorazione positivo per gli ExPA (CD)



LIMITI DELLA PROCEDURA

I sieri possono mostrare talvolta una colorazione marcata dovuta agli ANA o ad altri autoanticorpi. Questi possono interferire con la capacità di rilevare gli anticorpi anti-pancreas esocrino. In questi casi, la titolazione del siero può consentire la visualizzazione degli anticorpi anti-pancreas esocrino. In altri casi, il loro titolo può essere inferiore rispetto agli ANA o ad altri anticorpi, impedendone così il rilevamento. Il test per gli anticorpi anti-pancreas esocrino ImmuGlo™ non va eseguito su campioni macroscopicamente emolizzati, con contaminazione microbica o lipemici. Questo metodo deve essere utilizzato solo per testare campioni di siero umano.

VALORI PREVISTI

L'incidenza degli anticorpi anti-pancreas esocrino nei pazienti con IBD e nei soggetti normali è stata studiata da vari ricercatori. L'incidenza degli ExPA nella malattia di Crohn è risultata compresa fra il 30% e il 50% (vedere la Tabella 1)²⁻¹¹. La maggior parte degli studi clinici ha osservato che gli ExPA sono molto specifici per la malattia di Crohn, specialmente ai titoli più alti. Pochi studi hanno documentato un'associazione degli ExPA con particolari sottotipi di CD. Per esempio, Koutrobakis e coll. hanno riferito che 60 pazienti su 100 con CD stenotica erano positivi al test per gli ExPA⁵. L'incidenza degli ExPA varia inoltre in base all'etnia e all'età del paziente. Uno studio recente ha riferito un'incidenza maggiore nei pazienti cinesi con CD (46%) rispetto ai pazienti caucasici australiani con CD (22%)². Quando questi risultati venivano sottoclassificati in base ai gruppi di età, l'incidenza degli ExPA nei pazienti cinesi con CD ed età inferiore a 35 anni era ancora maggiore (67%).

In uno studio interno su piccola scala condotto su 25 pazienti con CD, 25 pazienti con UC e 25 controlli normali, gli autori hanno scoperto che il 56% dei pazienti con CD era positivo per gli ExPA, mentre tutti i pazienti con UC e i controlli normali erano negativi per gli ExPA. Sono stati testati i sieri dei pazienti con CD e UC alla ricerca di altri marcatori di IBD (pANCA, IgG ASCA, IgA ASCA) scoprendo che i test per gli ExPA erano in grado di rilevare una sottopopolazione di pazienti con CD che erano negativi per gli ASCA (Figura 2). Quindi, combinando i risultati degli ExPA con i test ASCA, la sensibilità del dosaggio è aumentata dal 52% al 76%, mettendo così l'accento sull'importanza di analizzare più marcatori per una distinzione accurata fra UC e CD (Tabella 2).

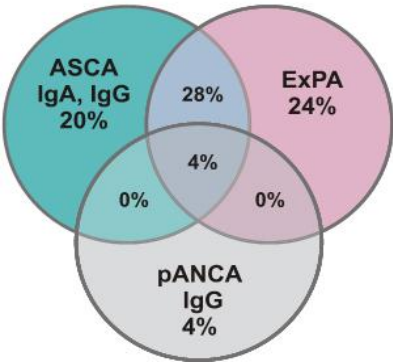
Tabella 1. Incidenza degli anticorpi anti-pancreas esocrino nei pazienti con malattia di Crohn.

Studio	Numero di pazienti con CD	% positivi
Lawrance e coll. 2005	50 cinesi di Hong Kong 50 caucasici australiani	46 22
Klebl e coll. 2005	208	29
Joossens e coll. 2004	169	32
Koutroubakis e coll. 2005	77	42
Seibold e coll. 1991	222	31
Stocker e coll. 1987	59	39
Folwaczny e coll. 1998	76	38
Seibold e coll. 1997	212	27
Studio IMMCO Diagnostics 2006	25	56

Tabella 2. Sensibilità e specificità di vari marcatori per IBD nello studio IMMCO Diagnostics.

Marcatore IBD	Sensibilità (%)	Specificità (%)
pANCA per UC	52	92
ExPA per CD	56	100
ASCA per CD	52	92
ExPA + ASCA per CD	76	92

Figura 2. Prevalenza dei marcatori per IBD nei pazienti con malattia di Crohn (studio IMCO Diagnostics, n = 25).



REFERENCES

1. Bossuyt X Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clinical Chemistry*; 2006, 52:171-181.
2. Lawrance IC, Hall A, Leong R, Pearce C, Murray K. A comparative study of goblet cell and pancreatic exocrine autoantibodies combined with ASCA and pANCA in Chinese and Caucasian patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis*; 2005, 10:890-897.
3. Klebl FH, Bataille F, Huy C, Hofstadter F, Scholmerich J, Rogler G. Association of antibodies to exocrine pancreas with subtypes of Crohn's disease. *European J Gastroenterol & Hepatol*; 2005, 17:73-77.
4. Joossens S, Vermeire S, Van Steen K, Godefroidis G, Claessens G, Pierik M et al. Pancreatic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*; 2004, 10:771-777.
5. Koutrobakis IE, Drygiannakis D, Karmiris K, Drygiannakis I, Makreas S, Kouromalis EA. Pancreatic autoantibodies in Greek patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*; 2005, 50:2330-2334.
6. Torok HP, Folwaczny C. Pancreatic autoantibodies in Crohn's disease: a feasible diagnostic tool. *European J Gastroenterol & Hepatol*; 2005, 17:37-39.
7. Seibold F, Weber P, Jenss H, Wiedmann KH. Antibodies to a trypsin sensitive pancreatic antigen in chronic inflammatory bowel disease: specific markers for a subgroup of patients with Crohn's disease. *Gut*; 1991, 32:1192-1197.
8. Stocker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Finkbeiner H, Stocker K et al. Autoimmunity to pancreatic juice in Crohn's disease. Results of an autoantibody screening in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*; 1987, 139:41-52.
9. Stocker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Stocker K, Jantschek G. Autoantibodies against the exocrine pancreas and against intestinal goblet cells in the diagnosis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Med Wochenschr*; 1984, 109:1963-1969.
10. Folwaczny C, Noehl N, Endres SP, Loeschke K, Fricke H. Antineutrophil and pancreatic antibodies in first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*; 1998, 33:523-528.
11. Seibold F, Mork H, Tanza S, Muller A, Holzhuter C, Weber P, Scheurlen M. Pancreatic autoantibodies in Crohn's disease: a family study. *Gut*; 1997, 40:557-558.
12. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York; 1987, 3rd Ed, 3-40.
13. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. [HHS Pub. No. (CDC) 1993, 93-8395].

For technical assistance please contact:



IMMCO Diagnostics, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante Autorizzato/Representante
Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

www.emergogroup.com

MAR2011

Document No. PI4194