



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) 



Anti-Endomysial Antibody (EMA) Test System

IVD

CLIA Complexity: High
 CDC Analyte Identification Code: 0497
 CDC Test System Identification Code: 28281

PRODUCT INSERT

REF 1114 Anti-Endomysial Antibody Test (Primate smooth muscle) 48 Determinations
REF 1114-96 Anti-Endomysial Antibody Test (Primate smooth muscle) 96 Determinations
REF 2160 Anti-Endomysial Antibody Test (Primate smooth muscle) 6 Wells

INTENDED USE

An indirect immunofluorescence antibody test for the qualitative and semi-quantitative detection of endomysial antibodies (EMA) in human serum as an aid in the diagnosis of celiac disease and dermatitis herpetiformis.

SUMMARY AND EXPLANATION

Endomysial antibodies (EMA), as reported in the literature, are detected primarily on the smooth muscle of monkey esophagus by indirect immunofluorescence. The detection of EMA aids in the diagnosis of *gluten sensitive enteropathy*, i.e. *celiac disease* (CD) and *dermatitis herpetiformis* (DH). Patients with CD and DH are reported to have antibodies to endomysium, reticulin and gliadin¹⁻¹². These serological markers have recently been incorporated into the revised criteria for the diagnosis of CD by the European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition¹³. Of the various antibody markers of CD and DH, EMA of the IgA class seem to be the most sensitive and specific marker. EMA of the IgG class also occur when IgA class EMA are in high titer or in individuals who are IgA deficient. A rapid decrease in EMA levels results with adherence to a gluten free diet. A gluten challenge or a failure to maintain a gluten free diet leads to the appearance or an increase in endomysial antibody titers. Patients on a gluten free diet >9 months have reduced or negative EMA titers if they adhere to their diet restrictions^{1,6-8,10}.

PRINCIPLES OF PROCEDURES

In the indirect immunofluorescence method, patient serum is incubated on tissue sections to allow binding of antibodies to the substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgA and IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled, anti-human immunoglobulin conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of EMA is demonstrated by an apple green fluorescence of the endomysial lining of smooth muscle bundles. The titer (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) of the antibody is then determined by testing serial dilutions¹⁴.

PRODUCT INFORMATION

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. Reagents are ready for use after equilibration to room temperature.

Materials Provided

ImmuGlo™ EMA Endomysial Antibody **REF** 1114, 1114-96

Kits contain sufficient reagents to perform 48 determinations each.

8 x	SORB SLD 6	6 well Primate Smooth Muscle Substrate Slides
16 x	SORB SLD 6	6 well Primate Smooth Muscle Substrate Slides (1114-96)
1 x 0.5 ml	CONTROL + EMA *	EMA Positive Control. Contains human serum.
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC EB *	Anti-human polyvalent FITC Conjugate containing Evan's Blue Protect from light. 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)

EN

1 x 60 ml **BUF** *

2 vials **BUF** **WASH**

1 x 5 ml **MOUNTING** **MEDIUM** *

1 x 12 **COVER** **SLD**

Optional components

1 x 5 ml **IgA/IgG-CONJ** **FITC** *

1 x 1 ml **EVANS**

1 x 5 ml **IgG-CONJ** **FITC** **PA** *

* Contains <0.1% NaN₃

Symbols used on labels:

LOT Lot number

REF Catalog number



Use by



Storage temperature



Read instructions for use

IVD In vitro diagnostic use



Manufacturer



Number of Tests

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
- Paper towels
- Incubation chamber

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. 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. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regard-less of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁵.

Sample Diluent.

Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.

Mounting Medium. Do not freeze. 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)

Coverslips 1 box (1114), 2 boxes (1114-96)

Anti-human IgG FITC Conjugate. Protect from light.

Evan's Blue Counterstain.

Anti-human IgG FITC Conjugate containing Evan's Blue (primate absorbed). Protect from light. Conjugate minimizes background reactions on primate tissues.

WARNING - Sodium azide (NaN_3) 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. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Do not use beyond expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Test Method

A. Screening

1. Dilute each patient serum 1:2.5 with the Sample Diluent provided (0.2 ml serum + 0.3 ml Diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for 10-15 minutes. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to 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.
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.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in 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.
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 Conjugate dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) to each well.
9. Repeat steps **7 and 8** for each slide.
10. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate 30 minutes at room temperature.
11. 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. If optional conjugate without counterstain is used (see optional components in Materials Provided Section), 2-3 drops of Evan's Blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **3 drops** of Mounting Medium evenly on the coverslip and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.

14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.

15. 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 antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed for up to 48 hours. Slides should be stored in the dark at 2-8°C.

B. Endpoint Determination (titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following steps 5 through 13 to determine the titer. Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make serial two-fold dilutions starting at 1:2.5. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

Preparation of Serial Dilutions

Number four tubes 1 through 4. Add 0.4 ml of Buffered Diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 4. Pipette 0.2 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 dilutions depicted in the following table:

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 etc.

QUALITY CONTROL

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run. The Negative Control should show no specific fluorescence of the endomysium lining of the smooth muscle bundles, whereas the Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of the tubules of these structures.

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, bulb beyond useful life expectancy, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.

RESULTS

The results of the tests for endomysial antibodies should be reported as negative (<2.5), positive greater or equal to 20, or preferably, positive with titer.

Read for specific staining of the endomysium lining of the smooth muscle bundles. **See Photo 1.** Endomysial antibodies react as a network of thin, irregular lines around the sarcolemma of the individual smooth muscle fibrils. This is in a sharp contrast to anti-smooth muscle antibodies which react with the sarcoplasm. **See Photo 2.**

Other detectable antibodies besides anti-smooth muscle antibodies (ASMA) include anti-nuclear antibodies (ANA). The presence of ASMA is known to cause false negative results for endomysial antibodies. If ASMA are detected, then the sample should be tested at higher dilutions¹. ANA reactions on smooth muscle tissue, when they occur, are usually weak and sparsely distributed and, therefore, unlikely to cause false negative results.

Consult Photo 1 and Photo 2 at the end of this document for example reactions.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

In some cases, sera positive for EMA may either be very weak or negative at the initial screening dilution (prozone phenomenon). In such doubtful cases the sera should be screened at higher dilutions and, if positive, antibody titer determined.

The presence of two or more antibodies in a serum which are reactive with the same tissue may cause an interference in their detection by immunofluorescence. This interference may cause either a failure to detect EMA or a suppression of its titer if the interfering antibody has a higher titer than EMA. The most common cause of the interference phenomenon in EMA tests is the coexistence of smooth muscle antibodies. It is recommended that patients sera which also contain ASMA be tested further at higher dilutions. IgA class ASMA are not a common occurrence. IgG class ASMA do not block IgA-EMA as the former react with the sarcoplasm of smooth muscle bundles and the latter react with the endomysium of the sarcolemma around the smooth muscle bundles. Anti-reticulin antibodies do not interfere with the reaction of EMA because they do not react with primate smooth muscle tissue. The coexistence of IgG class EMA may interfere with the detection of IgA class EMA. However, this rarely occurs as:

1. IgG class - EMA are present in only 25% of celiac disease patients,
2. IgG class - EMA titers are usually much lower than IgA-EMA titers and
3. IgA antibodies are usually of higher avidity than IgG antibodies.

In some patients with celiac disease and IgA deficiency, the IgA-class endomysial antibodies are absent. However, such patients are usually positive for IgG class EMA.

Patients with celiac disease on a gluten free diet for >9 months invariably are negative for EMA.

When making a diagnosis, results of all laboratory testing must always be evaluated along with the total clinical history of the patient.

EXPECTED VALUES

As seen in Table 1, EMA, as detected on primate smooth muscle are highly specific markers for celiac disease and dermatitis herpetiformis. The presence of EMA seems to be related to the intestinal pathology both in celiac disease and dermatitis herpetiformis rather than to the skin lesions in the latter, as depicted in Figure 1.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The Immuglo™ Anti-Endomysial Antibody (EMA) Test kit, using primate smooth muscle substrate and a polyvalent conjugate, was compared with another commercially available kit also using a polyvalent conjugate and monkey esophagus as a substrate. The comparison included a total of 68 sera: 20 from patients with clinically suspected celiac disease and 48 from normal controls. Sera were tested according to the procedure recommended by the manufacturer. A screening dilution of 2.5 was used and all sera positive for EMA were titrated to endpoint. The results were as follows:

		Immco™ EMA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other EMA IFA	POS (+)	18	0	18
	NEG (-)	2	48	50
	TOT (=)	20	48	68

relative specificity: 97%
relative sensitivity: 100%
relative agreement: 96%

Σύστημα ανάλυσης αντισωμάτων κατά του ενδομυΐου (EMA)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF	1114	Ανάλυση αντισωμάτων κατά του ενδομυΐου (λείος μυϊκός ιστός πρωτευνόντων)	48 Προσδιορισμοί
REF	1114-96	Ανάλυση αντισωμάτων κατά του ενδομυΐου (λείος μυϊκός ιστός πρωτευνόντων)	96 Προσδιορισμοί
REF	2160	Ανάλυση αντισωμάτων κατά του ενδομυΐου (λείος μυϊκός ιστός πρωτευνόντων)	6 Κυψελίδες

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια ανάλυση αντισωμάτων έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ποιοτική και την ημι-ποσοτική ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ενδομυΐου (EMA) σε ορό ανθρώπου, ως βοήθημα για τη διάγνωση ασθενών με κοιλιοκάκη και ερπητοειδή δερματίτιδα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα αντισώματα κατά του ενδομυΐου (EMA), όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ανιχνεύονται κυρίως στο λείο μυϊκό χιτώνα του οισοφάγου πιθήκων με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Η ανίχνευση αντισωμάτων EMA συμβάλλει στη διάγνωση της εντεροπάθειας από γλουτένη, δηλαδή της κοιλιοκάκης (ΚΚ) και της ερπητοειδούς δερματίτιδας (ΕΔ). Οι ασθενείς με ΚΚ και ΕΔ αναφέρεται ότι εμφανίζουν αντισώματα κατά του ενδομυΐου, της ρετικουλίνης και της γλιαδίνης¹⁻¹². Αυτοί οι ορολογικοί δείκτες έχουν πρόσφατα ενσωματωθεί στα αναθεωρημένα διαγνωστικά κριτήρια της ΚΚ από την Ευρωπαϊκή Εταιρία Παιδιατρικής Γαστρεντερολογίας και διατροφής¹³. Από τα διάφορα αντισώματα δείκτες CD και DH, τα αντισώματα EMA τάξης IgA φαίνεται ότι αποτελούν τον πιο ευαίσθητο και ειδικό δείκτη. Αντισώματα EMA τάξης IgG εμφανίζονται επίσης όταν τα αντισώματα EMA τάξης IgA βρίσκονται σε υψηλούς τίτλους ή σε άτομα με ανεπάρκεια IgA. Με τη συμμόρφωση σε μια δίαιτα ελεύθερη γλουτένης παρατηρείται μια ραγδαία πτώση των επιπέδων των αντισωμάτων EMA. Η δοκιμασία πρόκλησης με γλουτένη ή η αδυναμία τήρησης μιας δίαιτας ελεύθερης γλουτένης οδηγεί σε εμφάνιση ή αύξηση των τίτλων των αντισωμάτων κατά του ενδομυΐου. Οι ασθενείς με δίαιτα ελεύθερη γλουτένης διάρκειας >9 μηνών έχουν αρνητικούς ή μειωμένους τίτλους αντισωμάτων EMA, εφόσον συμμορφώνονται με τους διαιτητικούς περιορισμούς^{1,6-8,10}.

ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Στη μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού, ο ορός του ασθενούς επωάζεται σε τομές ιστών, προκειμένου να επιτευχθεί η δέσμευση των αντισωμάτων στο υπόστρωμα. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύονται απομακρύνονται με έκπλυση. Τα αντισώματα τάξης IgA και IgG που έχουν δεσμευθεί ανιχνεύονται με την επώαση του υποστρώματος με συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης IgG, το οποίο είναι σημασμένο με φλουροσκεΐνη. Οι αντιδράσεις παρακολουθούνται με μικροσκοπιο φθορισμού που διαθέτει τα κατάλληλα φίλτρα. Η παρουσία αντισωμάτων EMA διαπιστώνεται με την παρουσία φθορισμού έντονου πράσινου χρώματος στις παραφές των δερμάτων των λείων μήκων ινών του ενδομυΐου. Στη συνέχεια καθορίζεται ο τίτλος του αντισώματος (το αντίστροφο της υψηλότερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση) με ανάλυση διαδοχικών αραιώσεων¹⁵.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια φυλάσσονται στους 2-8°C. Τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση, εφόσον φθάσουν θερμοκρασία δωματίου.

Υλικά που παρέχονται

Αντισώματα κατά του ενδομυΐου (EMA) ImmuGlo™ **REF** 1114, 1114-96

8 x	SORB SLD 6	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος λείων μυϊκών ινών πρωτευνόντων με 6 κυψελίδες
16 x	SORB SLD 6	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος λείων μυϊκών ινών πρωτευνόντων με 6 κυψελίδες (1114-96)
1 x 0,5 ml	CONTROL + EMA *	Διάλυμα θετικού ελέγχου για EMA. Περιέχει ορό ανθρώπου.

EL

1 x 0,5 ml **CONTROL** - *

Διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Περιέχει ορό ανθρώπου.

1 x 5 ml **IgA/IgG-CONJ** **FITC** **EB** *

Πολυδύναμο συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με FITC, με επίχρωση Evans Blue. **Να προστατεύεται από το φως.** 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)

1 x 60 ml **BUF** *

Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων.

2 φιαλίδια **BUF** **WASH**

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Διαλύστε κάθε φιαλίδιο έως όγκο 1 λίτρου.

1 x 5,0 ml **MOUNTING** **MEDIUM** *

Μέσο επικάλυψης. Να μην καταψύχεται. 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)

1 x 12 **COVER** **SLD**

Καλυπτρίδες 1 box (1114), 2 boxes (1114-96)

Προαιρετικά συστατικά

1 x 5 ml **IgA/IgG-CONJ** **FITC** *

Συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης IgG συζευγμένο με FITC. Να προστατεύεται από το φως.

1 x 5 ml **IgG-CONJ** **FITC** **PA** *

Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgG με χρωστική Evans Blue (πίθηκος που απορροφάται). Να προστατεύεται από το φως. Μειώνει το φθορισμό υποβάθρου στους υπόστρωμα πιθήκων

1 x 1,0 ml **EVANS**

Επίχρωση Evans blue.

* Περιέχει < 0,1% NaN₃

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT Αριθμός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου

 Ημερομηνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

IVD In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Μικροσκόπιο φθορισμού
- Μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur
- Ορολογικές πιπέτες
- Τρυβλίο χρώσης (π.χ. δοχείο Coplin)
- Μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 13 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Δοχείο ενός λίτρου
- Φιάλη έκπλυσης
- Απορροφητικά χαρτιά
- Θάλαμος επώασης

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HbsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Όλα τα δείγματα ανθρώπινου ορού και προϊόντων ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα, ανεξάρτητα από την προέλευσή τους. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹⁵.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN_3) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση αυτής της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2-8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, ο ορός θα πρέπει να καταψυχθεί στους -20°C. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μέθοδος ανάλυσης

A. Διαλογή

1. Αραιώστε τον ορό κάθε ασθενούς σε αναλογία 1:2,5 με το διάλυμα αραιώσης δειγμάτων που παρέχεται (0,2 μl ορού + 0,3 ml διάλυμα αραιώσης). Μην αραιώνετε τα διαλύματα θετικού ή αρνητικού ελέγχου. Φυλάξτε τους αδιάλυτους ορούς για να προσδιορίσετε τους τίτλους αντισωμάτων, εάν οι αναλύσεις διαλογής βρεθούν θετικές.
2. Αφήστε τις θήκες που περιέχουν τις αντικειμενοφόρους του υποστρώματος επί 10-15 λεπτά, προκειμένου να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρέστε προσεκτικά τις αντικειμενοφόρους χωρίς να αγγίξετε το υπόστρωμα.
3. Σημάνετε τις αντικειμενοφόρους και τοποθετήστε τις σε ένα θάλαμο επώασης που έχετε καλύψει με απορροφητικό χαρτί διαβρεγμένο με νερό για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση.
4. Αναστρέψτε το σταγονόμετρο και πιέστε το ελαφρά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl του διαλύματος αρνητικού ελέγχου στην κυψελίδα υπ' αριθμό 1. Με τον ίδιο τρόπο, προσθέστε 1 σταγόνα διαλύματος θετικού ελέγχου ANA στην κυψελίδα υπ' αριθμό 2. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
5. Χρησιμοποιώντας μια μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur, προσθέστε 1 σταγόνα από τον αραιωμένο ορό του ασθενούς (περίπου 50 μl) στις υπόλοιπες κυψελίδες. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
6. Τοποθετήστε το καπάκι στο θάλαμο επώασης και επώαστε τις αντικειμενοφόρους επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εκπλύνετε με περίπου 10 ml PBS χρησιμοποιώντας μια πιπέτα ή εκπλύνετε την αντικειμενοφόρο σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει PBS. Μην χρησιμοποιείτε φιάλη έκπλυσης. Μεταφέρετε την αντικειμενοφόρο αμέσως στο δοχείο Corlin και εκπλύνετε επί 10 λεπτά. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.

8. Αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους από το δοχείο Corlin. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο σε θάλαμο επώασης. Αναστρέψτε αμέσως το σταγονόμετρο με το συζευκτικό αντίσωμα και πιέστε μαλακά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μ l) σε κάθε κυψελίδα.
9. Επαναλάβετε τα βήματα **7 και 8** για κάθε αντικειμενοφόρο.
10. Τοποθετήστε εκ νέου το καπάκι στο θάλαμο επώασης. Επώαστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εμβαπτίστε την σε ένα ποτήρι ζέσεως με PBS για να αφαιρέσετε την περίσσεια συζευκτικού αντισώματος. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε ένα τρυβλίο χρώσης που έχει πληρωθεί με PBS επί 10 λεπτά. Εάν χρησιμοποιηθεί προαιρετικό συζευκτικό αντίσωμα χωρίς επίχρωση (δείτε τα προαιρετικά συστατικά στην ενότητα "Υλικά που παρέχονται"), μπορείτε να προσθέσετε 2-3 σταγόνες επίχρωσης Evans blue στην τελική έκπλυση. Επαναλάβετε για τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τυχόν ακατάλληλη έκπλυση ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένο φθορισμό υποβάθρου.
12. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το τρυβλίο χρώσης. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. **Για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανσή της αντικειμενοφόρου, προχωρήστε αμέσως στο επόμενο βήμα ενώ η αντικειμενοφόρος είναι ακόμη υγρή.**
13. Εφαρμόστε την καλυπτρίδα, προσθέτοντας **3 σταγόνες** μέσου επικάλυψης ομοιόμορφα επάνω στην καλυπτρίδα και τοποθετήστε την πάνω στην αντικειμενοφόρο. Αποφύγετε την εφαρμογή άσκοπης πίεσης και αποτρέψτε την πλευρική πίεση της καλυπτρίδας.
14. Επαναλάβετε τα βήματα **12 και 13** για κάθε αντικειμενοφόρο.
15. Εξετάστε για ειδικό φθορισμό με μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση 200x ή μεγαλύτερη.

Οι αντικειμενοφόροι μπορούν να διαβαστούν μόλις προετοιμαστούν. Ωστόσο, εξαιτίας της παρουσίας παράγοντα προστασίας φθορισμού στο μέσο καθήλωσης, δεν εμφανίζεται σημαντική απώλεια της έντασης της χρώσης, εάν καθυστερήσει η ανάγνωση έως και 48 ώρες. Οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να φυλάσσονται σε σκοτεινό χώρο, σε θερμοκρασία 2-8°C.

B. Προσδιορισμός τελικού σημείου (τιτλοδότηση)

Ένα ορός που θα βρεθεί θετικός στην ανάλυση διαλογής μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω, ακολουθώντας τα βήματα 5 έως 13 για να καθοριστεί ο τίτλος του. Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τα διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου. Εκτελέστε διαδοχικές διπλές αραιώσεις ξεκινώντας από την αναλογία 1:2,5. Ο τίτλος είναι το αντίστροφο της μεγαλύτερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση.

Προετοιμασία των διαδοχικών αραιώσεων

Αριθμήστε τέσσερα σωληνάρια από το 1 έως το 4. Προσθέστε 0,4 ml αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα στο σωληνάριο 1 και 0,2 ml στα σωληνάρια 2 έως 4. Μεταφέρετε με πιπέτα 0,2 ml μη αραιωμένου ορού στο σωληνάριο 1 και αναμίξτε επιμελώς. Μεταφέρετε 0,2 ml από το σωληνάριο 1 στο σωληνάριο 2 και αναμίξτε επιμελώς. Συνεχίστε τη μεταφορά 0,2 ml από το ένα σωληνάριο στο επόμενο μετά από ανάμιξη, προκειμένου να επιτύχετε τις αραιώσεις που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Σωληνάριο	1	2	3	4
Ορός	0,1 ml +			
Αραιωτικό ρυθμιστικό	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↗	↗	↗
Μεταφορά		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Τελική αραιώση	1:5	1:10	1:20	1:40 κλπ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τόσο ένα διάλυμα θετικού όσο και ένα διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου θα πρέπει να μην παρουσιάζει ειδικό φθορισμό του ενδοκυτταρικού περιβλήματος των δερματίων των λείων μυϊκών ινών, ενώ το διάλυμα θετικού ελέγχου θα πρέπει να παρουσιάζει ένταση φθορισμού των σωληνίσκων αυτών των δομών 2+ ή μεγαλύτερη.

Εάν δεν λάβετε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, θα πρέπει να επαναλάβετε την ανάλυση. Εάν συνεχίζουν να εμφανίζονται ανεπαρκή αποτελέσματα με τα διαλύματα ελέγχου, αυτά ενδέχεται να οφείλονται σε:

- Θολερότητα. Απορρίψτε το διάλυμα ελέγχου και χρησιμοποιήστε ένα άλλο.
- Προβλήματα με το οπτικό σύστημα του μικροσκοπίου φθορισμού. Σε αυτά ενδέχεται να συμπεριλαμβάνονται: ακατάλληλη ευθυγράμμιση, παρέλευση της ωφέλιμης διάρκειας ζωής της λυχνίας, κλπ.
- Αποξήρανση της αντικειμενοφόρου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων για αντισώματα κατά του ενδοκυτταρικού θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά (<2,5), θετικά (μεγαλύτερα ή ίσα με 20) ή κατά προτίμηση, θετικά με τίτλο.

Εξετάστε για ειδική χρώση του ενδοκυτταρικού περιβλήματος των δερματίων των λείων μυϊκών ινών. **Βλ. φωτογραφία 1.** Τα αντισώματα κατά του ενδοκυτταρικού αντιδρούν ως δίκτυο λεπτών, ακανόνιστων γραμμών που περιβάλλουν το σαρκεύλημα του κάθε λείου μυϊκού ινιδίου. Αυτό αποτελεί σημαντική διαφορά σε σχέση με τα αντισώματα κατά των λείων μυϊκών ινών, τα οποία αντιδρούν με το σαρκόπλασμα. **Βλ. φωτογραφία 2.**

Στα υπόλοιπα αντισώματα που μπορούν να ανιχνευθούν, εκτός των αντισωμάτων κατά των λείων μήκων ινών (ASMA), περιλαμβάνονται τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA). Η παρουσία ASMA είναι γνωστό ότι προκαλεί ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα για αντισώματα κατά του ενδοκυτταρικού. Εάν ανιχνευθούν ASMA, θα πρέπει στη συνέχεια το δείγμα να αναλυθεί σε υψηλότερες αραιώσεις¹. Οι αντιδράσεις ANA σε λείο μυϊκό ιστό, όταν εμφανίζονται, είναι συνήθως ασθενείς και κατανέμονται διάσπαρτα, συνεπώς είναι απίθανο να προκαλέσουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Συμβουλευτείτε τη φωτογραφία 1 και τη φωτογραφία 2 στο τέλος αυτού του εντύπου για παραδείγματα αντιδράσεων.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οροί θετικοί για EMA ενδέχεται να εμφανιστούν πολύ ασθενείς ή αρνητικοί στην αρχική αραιώση διαλογής (φαινόμενο προζώνης). Σε τέτοιες αμφίβολες περιπτώσεις, οι οροί θα πρέπει να εξετάζονται σε υψηλότερες αραιώσεις, και εάν βρεθούν θετικοί, να καθορίζονται οι τίτλοι των αντισωμάτων.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η παρουσία δύο ή περισσότερων αντισωμάτων σε έναν ορό, τα οποία αντιδρούν με τον ίδιο ιστό, ενδέχεται να επηρεάζει την ανίχνευσή τους με ανοσοφθορισμό. Αυτή η επίδραση ενδέχεται να προκαλέσει είτε αδυναμία ανίχνευσης αντισωμάτων EMA είτε μείωση του τίτλου εάν το αντίσωμα που επιδρά έχει μεγαλύτερο τίτλο από το αντίσωμα EMA. Η πιο συνηθισμένη αιτία του φαινομένου παρεμβολής σε αναλύσεις EMA είναι η συνύπαρξη αντισωμάτων κατά των λείων μυϊκών ινών. Συνιστάται οι οροί ασθενών που περιέχουν και αντισώματα ASMA να εξετάζονται περαιτέρω σε υψηλότερες αραιώσεις. Δεν εμφανίζονται συχνά αντισώματα ASMA τάξης IgA. Τα αντισώματα ASMA τάξης IgG δεν αποκλείουν τα IgA-EMA, καθώς τα πρώτα αντιδρούν με το σαρκόπλασμα των δερματίων των λείων μυϊκών ινών και τα τελευταία αντιδρούν με το ενδοκυτταρικό του σαρκευλήματος που βρίσκεται γύρω από τα δερμάτια των λείων μυϊκών ινών. Τα αντισώματα κατά της ρετικουλίνης δεν παρεμβαίνουν στην αντίδραση των αντισωμάτων EMA, καθώς δεν αντιδρούν με το λείο μυϊκό ιστό των πρωτευόντων. Η συνύπαρξη αντισωμάτων EMA τάξης IgG ενδέχεται να επηρεάσει την ανίχνευση EMA τάξης IgA. Ωστόσο, κάτι τέτοιο συμβαίνει σπάνια καθώς:

1. Αντισώματα EMA τάξης IgG υπάρχουν μόνο στο 25% των ασθενών με κοιλιοκάκη,
2. Οι τίτλοι των αντισωμάτων EMA τάξης IgG είναι συνήθως πολύ χαμηλότεροι από τους τίτλους των αντισωμάτων EMA τάξης IgA και
3. Τα αντισώματα IgA εμφανίζουν συνήθως μεγαλύτερη ισχύ σύνδεσης αντιγόνου αντισώματος από τα αντισώματα IgG.

Σε ορισμένους ασθενείς με κοιλιοκάκη και ανεπάρκεια IgA, απουσιάζουν τα αντισώματα κατά του ενδομυϊού τάξης IgA. Ωστόσο, αυτοί οι ασθενείς είναι συνήθως θετικοί για αντισώματα EMA τάξης IgG.

Ασθενείς με κοιλιοκάκη οι οποίοι ακολουθούν δίαιτα ελεύθερη γλουτένης για χρονικό διάστημα >9 μήνες είναι σταθερά αρνητικοί για αντισώματα EMA.

Για να τεθεί μια διάγνωση, θα πρέπει πάντοτε να αξιολογούνται τα αποτελέσματα όλων των εργαστηριακών αναλύσεων σε συνδυασμό με το κλινικό ιστορικό του ασθενούς.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1, τα αντισώματα EMA, που ανιχνεύονται σε λείο μυϊκό ιστό πρωτευνόντων είναι δείκτες με υψηλή ειδικότητα για κοιλιοκάκη και ερπητοειδή δερματίτιδα. Η παρουσία αντισωμάτων EMA φαίνεται να σχετίζεται με την παθολογία του εντέρου τόσο στην κοιλιοκάκη όσο και στην ερπητοειδή δερματίτιδα, παρά με τις δερματικές βλάβες της τελευταίας, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 1.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Το kit του συστήματος ανάλυσης αντισωμάτων κατά του ενδομυϊού (EMA) Immuco™, το οποίο χρησιμοποιεί υπόστρωμα λείου μυός πρωτευνόντων και ένα πολυδύναμο συζευκτικό αντίσωμα, συγκρίθηκε με ένα άλλο kit που διατίθεται στο εμπόριο, το οποίο χρησιμοποιεί επίσης πολυδύναμο συζευκτικό αντίσωμα και οισοφάγο πιθήκου ως υπόστρωμα. Η σύγκριση συμπεριέλαβε ένα σύνολο 68 ορών: 20 από ασθενείς με κλινική υποψία κοιλιοκάκης και 48 από φυσιολογικούς μάρτυρες. Οι οροί αναλύθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που προτείνεται από τον παρασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκε αραιώση διαλογής 2,5 και όλοι οι οροί που βρέθηκαν θετικοί για αντισώματα EMA τιτλοποιήθηκαν μέχρι το τελικό σημείο. Τα αποτελέσματα έχουν ως εξής:

		Immco™ EMA		
		Θετικά (+)	Αρνητικά (-)	Σύνολο (=)
Άλλη EMA IFA	Θετικά (+)	18	0	18
	Αρνητικά (-)	2	48	50
	Σύνολο (=)	20	48	68

σχετική ειδικότητα: 97%

σχετική ευαισθησία: 100%

σχετική συμφωνία: 96%

Ensayo para detección de anticuerpos antiendomisiales (EMA)

IVD

PROSPECTO

REF 1114 Anticuerpos antiendomisiales (músculo liso de mono) 48 análisis

REF 1114-96 Anticuerpos antiendomisiales (músculo liso de mono) 96 análisis

REF 2160 Anticuerpos antiendomisiales (músculo liso de mono) Portas 6 pocillos

USO PREVISTO

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IF) para la detección y semicuantificación de anticuerpos antiendomisiales (EMA) en suero humano como ayuda en el diagnóstico de la enfermedad celíaca y la dermatitis herpetiforme.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La literatura específica informa que los anticuerpos endomisiales (EMA) se detectan principalmente en la musculatura lisa del esófago de mono mediante inmunofluorescencia indirecta. La detección de EMA ayuda en el diagnóstico de las *enteropatías sensibles al gluten*, tales como la *enfermedad celíaca* (EC) y la *dermatitis herpetiforme*. (DH). Se señala que los pacientes con EC y DH presentan anticuerpos antiendomisiales, antireticulina y antigliadina¹⁻¹². Estos marcadores serológicos han sido incorporados a los criterios revisados de la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica para el diagnóstico de la EC¹³. De los diferentes marcadores de anticuerpos de EC y DH, los EMA del isotipo IgA parecen ser los más sensibles y específicos. Los EMA de clase IgG se presentan también cuando los EMA de clase IgA tienen título alto o en individuos con deficiencia de IgA. Una dieta estricta sin gluten provoca una rápida disminución de los niveles de EMA; contrariamente, una carga de gluten o el abandono de la dieta sin gluten provoca la aparición de anticuerpos endomisiales o el aumento de sus títulos. Los pacientes que siguieron estrictamente una dieta sin gluten durante 9 meses redujeron los títulos de EMA o resultaron negativos a estos anticuerpos^{1,6-8,10}.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

En el método de inmunofluorescencia indirecta, el suero del paciente se incuba en cortes de tejido para permitir que los anticuerpos se unan al sustrato. Los anticuerpos no unidos se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos de clase IgA e IgG se detectan incubando el sustrato con conjugado de inmunoglobulina antihumana marcado con fluoresceína. Las reacciones se observan en microscopio de fluorescencia con filtros adecuados. La presencia de EMA es revelada por una fluorescencia de color verde manzana en el revestimiento endomisial de los haces de músculo liso. El título del anticuerpo (el recíproco de la mayor dilución que provocó una reacción positiva) se determina analizando las diluciones seriadas.¹⁴

DATOS DEL PRODUCTO

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. Los reactivos están listos para su uso tan pronto como alcanzan la temperatura ambiente.

Material suministrado

Ensayo para anticuerpos antiendomisiales EMA ImmuGlo™ **REF** 1114, 1114-96

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 48 análisis cada uno.

8 x	SORB SLD 6	Portas de sustrato de músculo liso de mono, 6 pocillos
16 x	SORB SLD 6	Portas de sustrato de músculo liso de mono, 6 pocillos (1114-96)
1 x 0.5 ml	CONTROL + EMA *	Control positivo EMA. Contiene suero humano.
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Control negativo. Contiene suero humano.
1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC EB *	Conjugado polivalente anti-humano con FITC. Contiene contraste azul de Evans. Protéjase de la luz. 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)

ES

1 x 60 ml **BUF** *

2 viales **BUF** **WASH**

1 x 5.0 ml **MOUNTING** **MEDIUM** *

1 x 12 **COVER** **SLD**

Componentes opcionales

1 x 5 ml **IgA/IgG-CONJ** **FITC** *

1 x 5 ml **IgG-CONJ** **FITC** **PA** *

1 x 1.0 ml **EVANS**

* Contiene <0.1% NaN₃

Símbolos empleados en las etiquetas:

LOT Número de lote

REF Número de catálogo

 Fecha de caducidad

 Temperatura de conservación

 Léanse las instrucciones de uso

IVD Para diagnóstico *in vitro*

 Fabricante

 Número de análisis

Material necesario no incluido

- Microscopio de fluorescencia
- Micropipetas o pipetas Pasteur
- Pipetas serológicas
- Cubeta de tinción (p.ej. cubeta de Coplin)
- Tubos de ensayo pequeños (p.e. 13 x 75 mm) y gradilla para tubos
- Agua destilada o desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco lavador
- Toallas de papel
- Cámara de incubación

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo material de origen humano usado en la preparación de este producto se ha examinado con métodos aprobados por la FDA, y resultó negativo a anticuerpos contra HIV, HbsAg y HCV. Las muestras de suero humano y los productos de origen humana deben considerarse potencialmente peligrosos

Diluyente de muestras.

Tampón fosfato salino (PBS). Disolver cada vial hasta 1 litro.

Medio de montaje. No congelar. 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)

Cubreobjetos 1 box (1114), 2 boxes (1114-96)

Conjugado de IgA antihumano con FITC. Protéjase de la luz.

Conjugado de IgG anti humana con FITC. Contiene contraste azul de Evans (primate absorbente). Protejase de la luz. Conjugación reduce al mínimo reacciones del fondo en tejidos del primate

Contraste azul de Evans.

independientemente de su origen. Respétense las buenas prácticas de laboratorio al conservar, dispensar y eliminar tales materiales¹⁵.

ATENCIÓN: la azida de sodio (NaN_3) puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías y formar azidas metálicas altamente explosivas. Después de dispensar líquidos, se recomienda lavar con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas. La azida de sodio puede ser tóxica por ingestión; en caso de ingestión accidental, informe inmediatamente del hecho al director del laboratorio o a un centro de control de envenenamientos.

Siga estrictamente las instrucciones tal como se presentan en este prospecto para garantizar resultados válidos. No cambie los componentes del kit con otros de otras fuentes o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. No los utilice después de la fecha de caducidad.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Este procedimiento requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas con microbios. Conserve las muestras a 2-8°C por no más de una semana. Para una conservación más prolongada, congele el suero a -20°C. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO

Metodología del análisis

A. Control

1. Diluya el suero del paciente en proporción 1:2.5 con el diluyente de muestras del kit (0.2 ml de suero + 0,3 ml de diluyente). No diluya los controles positivo o negativo. Conserve el suero no diluido para determinar la titulación de anticuerpos si los análisis resultaran positivos.
2. Espere a que las bolsas con los portas de sustrato se estabilicen a la temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraiga los portas cuidadosamente sin tocar el sustrato.
3. Etiquete los portas y colóquelos en la cámara de incubación acondicionada con toallas de papel humedecidas para mantener las condiciones de humedad adecuadas.
4. Invierta el frasco gotero y aplique suavemente 1 gota (aproximadamente 50 µl) de control negativo en el pocillo #1. Del mismo modo, aplique 1 gota de control positivo en el pocillo #2. No llene demasiado los pocillos.
5. Con una micropipeta o pipeta Pasteur, coloque 1 gota de suero diluido del paciente (aprox. 0,05 ml) en los restantes pocillos. No llene demasiado los pocillos.
6. Coloque la tapa de la cámara de incubación; incube los portas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Retire un porta de la cámara de incubación. Sosteniéndolo por un extremo, lávelo delicadamente con una pipeta y aproximadamente 10 ml de PBS, o bien en un recipiente lleno de PBS. No utilice frasco de lavado. Transfiera de inmediato el porta a una cubeta de Coplin y lávelo durante 10 minutos. Repita el procedimiento con los restantes portas.
8. Retire los portas de la cubeta de Coplin. Seque el borde de los portas con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Ponga los portas en la cámara de incubación. Acto seguido, con el frasco gotero de conjugado aplique 1 gota (aproximadamente 0,05 ml) a cada pocillo.
9. Repita los **pasos 7 y 8** para cada porta.
10. Coloque la tapa en la cámara de incubación. Incube 30 minutos a temperatura ambiente .
11. Extraiga un porta del incubador. Sosteniéndolo por un extremo, sumérjalo en un recipiente con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Ponga los portas en una cubeta de coloración llena de PBS durante 10 minutos. Si está usando el conjugado opcional sin contraste (véanse los componentes opcionales en el apartado "Material suministrado"), puede añadir 2-3 gotas de azul de Evans en el lavado final. NOTA: un lavado inadecuado podría aumentar la fluorescencia de fondo.
12. Retire un porta de la cubeta de coloración. Seque el borde con una toalla para eliminar el exceso de PBS. **Para evitar que el porta se seque, pase de inmediato a la fase sucesiva mientras el porta todavía está húmedo.**
13. Monte el cubre aplicando uniformemente **3 gotas de medio de montaje en la superficie y colóquelo sobre el porta sin presionar demasiado y evitando que el cubre se desplace lateralmente.**
14. Repita los pasos 12 y 13 para cada porta.

15. Examine la fluorescencia específica con microscopio de fluorescencia con aumento de 200x o más.

Los portas se han de leer tan pronto como estén listos. Sin embargo, gracias a la presencia de un agente antidecoloración en el medio de montaje, no se produce una disminución significativa en la intensidad de coloración aunque la lectura se postergue por 48 horas. Los portas deben conservarse en la oscuridad a una temperatura entre 2 y 8°C.

B. Determinación de punto final (titulación)

Un suero que resulte positivo en la fase de control puede ser analizado nuevamente siguiendo los pasos de 5 a 13 para determinar el título. Cada ciclo de análisis incluirá los controles positivo y negativo. Prepare diluciones en serie y por duplicado a partir de 1:2.5. El recíproco de la mayor dilución que provoca una reacción positiva es la titulación.

Preparación de diluciones seriadas

Numere cuatro tubos de 1 a 4. Ponga 0,4 ml de diluyente tamponado en el número 1 y 0,2 ml en los tubos de 2 a 4. Pipetee 0,2 ml de suero sin diluir en el tubo 1 y mezcle bien. Transfiera 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezcle bien. Siga transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente después de mezclar hasta producir las diluciones indicadas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4
Suero	0,1 ml			
	+			
Diluyente tamponado	0,4 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻
Transferir		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Dilución final	1:5	1:10	1:20	1:40 etc.

CONTROL DE CALIDAD

En cada ciclo de análisis se deben incluir un control positivo y un control negativo. El control negativo no debe evidenciar una fluorescencia específica del revestimiento endomisial de los haces del músculo liso; el control positivo debe tener una intensidad de tinción de 2+ o superior en los túbulos de esas estructuras.

Si no se obtienen los resultados esperados, hay que repetir el análisis. Si se siguen obteniendo resultados inadecuados con los controles, puede deberse a:

- Turbidez. Descarte el control y utilice otro.
- Problemas en el sistema óptico del microscopio de fluorescencia tales como alineación incorrecta, lámpara que debe ser cambiada, etc.
- El porta se secó durante el proceso.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de los análisis de anticuerpos antiendomisiales deben considerarse negativos (título inferior a 2,5), positivos (título igual o superior a 20) o, preferiblemente, positivos con título.

Lea la coloración específica del revestimiento endomisial de los haces de músculo liso. **Véase la foto 1.** Los anticuerpos antiendomisiales reaccionan como una red de líneas finas e irregulares alrededor del sarcolema de las fibras del músculo liso. Esto contrasta fuertemente con los anticuerpos anti músculo liso, que reaccionan con el sarcoplasma. **Véase la foto 2.**

Otros anticuerpos detectables, además de aquellos anti músculo liso (ASMA), comprenden los anticuerpos anti-nucleares (ANA). Es sabido que la presencia de ASMA provoca resultados falsamente negativos de anticuerpos anti-endomisiales. Si se detectaran ASMA, la muestra debe analizarse nuevamente con una dilución mayor¹. Las reacciones ANA en tejido de músculo liso, cuando se presentan, normalmente son débiles y mal distribuidas, por tanto, difícilmente podrían dar resultados falsamente negativos.

Véanse ejemplos de reacciones en las fotos 1 y 2 al final de este documento.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunos casos, un suero positivo a EMA puede resultar muy débil o negativo en el control inicial de dilución (fenómeno prozona). En estos casos dudosos, el suero debe ser sometido a control en diluciones más altas; si resultara positivo, se determinarán los títulos del anticuerpo.

En algunos casos, la presencia en un suero de dos o más anticuerpos que reaccionan con el mismo sustrato puede provocar interferencias en la detección mediante inmunofluorescencia. Esta interferencia podría impedir la detección de los EMA o la supresión de su título si el anticuerpo interferente tiene un título superior al de EMA. La causa más frecuente de interferencia en ensayos EMA es la coexistencia de anticuerpos anti-músculo liso. Se recomienda analizar nuevamente, con una dilución superior, el suero de pacientes que presente también ASMA. Los ASMA de la clase IgA no son comunes. Los ASMA de clase IgG no bloquean los anticuerpos EMA de clase IgA, porque los primeros reaccionan con el sarcoplasma de los haces de músculo liso, y los segundos con el endomisio del sarcolema alrededor de los haces de músculo liso. Los anticuerpos antireticulina no interfieren con la reacción de EMA porque no reaccionan con el tejido muscular liso de mono. La presencia simultánea de EMA de clase IgG puede interferir con la detección de los EMA de clase IgA, aunque es un caso que se presenta raramente, como se detalla a continuación:

1. Sólo el 25% de los pacientes celíacos presenta EMA de clase IgG
2. Normalmente, los títulos de los EMA de clase IgG son muy inferiores a los títulos de EMA IgA
3. Normalmente, la avidéz de los anticuerpos IgA es superior a la de los anticuerpos IgG.

En ciertos pacientes con celiaquía y deficiencia de IgA están ausentes los anticuerpos antiendomisiales de clase IgA. Pese a ello, esos pacientes normalmente son positivos a los EMA de clase IgG.

Los pacientes celíacos que siguen una dieta carente de gluten durante >9 meses son invariablemente negativos a los EMA.

Al formular un diagnóstico, se deben evaluar los resultados de todos los análisis de laboratorio junto con la historia clínica completa del paciente.

VALORES ESPERADOS

Como puede verse en la Tabla 1, los EMA, tal como se detectan en el músculo liso de mono, son marcadores altamente específicos de enfermedad celíaca y dermatitis herpetiforme. La presencia de EMA parece estar relacionada con una patología intestinal tanto en la celiaquía como en la dermatitis herpetiforme, antes que con las lesiones de la piel en la segunda, como se indica en la figura 1.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El ensayo para anticuerpos antiendomisiales (EMA) ImmcoTM EMA que utiliza sustrato de músculo liso de mono y un conjugado polivalente, se comparó con otro ensayo disponible en comercio que también utiliza un conjugado polivalente y esófago de mono como sustrato. Para la comparación se utilizaron 68 sueros en total: 20 de pacientes en quienes los datos clínicos indicaban una probable celiaquía, y 48 de controles normales. Para analizar los sueros se siguió el procedimiento indicado por el fabricante. Se utilizó una dilución de control de 2,5 y todos los sueros positivos a EMA se titularon con punto final. Los resultados fueron los siguientes:

		Immco TM EMA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Otro EMA IFA	POS (+)	18	0	18
	NEG (-)	2	48	50
	TOT (=)	20	48	68

Especificidad relativa: 97%

Sensibilidad relativa: 100%

Correspondencia relativa: 96%

Anti-endomysiale-Antikörper-Testsystem (EMA)

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1114 Test für anti-endomysiale Antikörper (glatter Primatenmuskel) 48 Bestimmungen

REF 1114-96 Test für anti-endomysiale Antikörper (glatter Primatenmuskel) 96 Bestimmungen

REF 2160 Test für anti-endomysiale Antikörper (glatter Primatenmuskel) 6 Vertiefungen

VERWENDUNGSZWECK

Ein indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest für den qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von endomysialen Antikörpern (EMA) in Humanserum als Hilfsmittel bei der Diagnose von Zöliakie und Dermatitis herpetiformis.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Wie in der Literatur beschrieben, werden endomysiale Antikörper (EMA) hauptsächlich auf dem glatten Muskel des Affenösoophagus mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Der Nachweis von EMA hilft bei der Diagnose von *glutenbedingten Enteropathien*, d.h. Zöliakie und *Dermatitis herpetiformis* (DH). Bei Patienten mit Zöliakie und DH wird über Antikörper gegen Endomysium, Retikulin und Gliadin berichtet¹⁻¹². Diese serologischen Marker wurden vor kurzem von der European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition in deren überarbeitete Kriterien für die Diagnose von Zöliakie aufgenommen¹³. Unter den verschiedenen Antikörpermarkern für Zöliakie und DH scheinen die EMA der Klasse IgA die empfindlichsten und spezifischsten Marker zu sein. Bei einem hohen Titer von EMA der Klasse IgA oder bei Patienten mit IgA-Mangel treten auch EMA der Klasse IgG auf. Mit dem Einhalten einer glutenfreien Ernährung kommt es zu einem schnellen Abfall des EMA-Spiegels. Eine Glutenbelastung oder das Nichteinhalten der glutenfreien Ernährung führen zum Auftreten oder zur Erhöhung des Titers von endomysialen Antikörpern. Patienten, die sich länger als 9 Monate lang glutenfrei ernähren, weisen einen verminderten oder negativen EMA-Titer auf, wenn sie sich an ihre Ernährungsbeschränkungen halten^{1,6-8,10}.

TESTPRINZIPIEN

Bei der indirekten Immunfluoreszenzmethode wird Patientenserum auf Gewebeschnitten inkubiert, um die Bindung der Antikörper an das Substrat zu ermöglichen. Nicht gebundene Antikörper werden durch Spülen entfernt. Gebundene Antikörper der Klassen IgA und IgG werden durch Inkubieren des Substrats mit Fluorescein-markiertem Anti-human-Immunglobulin-Konjugat nachgewiesen. Die Reaktionen werden unter einem mit den passenden Filtern versehenen Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Das Vorhandensein von EMA wird durch eine apfelgrüne Fluoreszenz auf der Endomysiumschicht der glatten Muskelbündel nachgewiesen. Der Titer (Kehrwert der höchsten Verdünnung, die zu einer positiven Reaktion führt) des Antikörpers wird anschließend durch die Untersuchung von Verdünnungsreihen bestimmt¹⁴.

PRODUKTINFORMATION

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, nachdem sie Raumtemperatur erreicht haben.

Mitgelieferte Materialien

ImmuGlo™ endomysiale Antikörper (EMA) **REF** 1114, 1114-96

8 x	SORB SLD 6	Substrat-Objektträger mit 6 Vertiefungen, glatter Muskel von Primaten
16 x	SORB SLD 6	Substrat-Objektträger mit 6 Vertiefungen, glatter Muskel von Primaten (1114-96)
1 x 0,5 ml	CONTROL + EMA *	EMA-positives Kontrollserum. Enthält Humanserum.

DE

1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Negatives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC EB *	Polyvalentes Anti-human- FITC-Konjugat mit Evans-Blau. Vor Licht schützen. 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)
1 x 60 ml	BUF *	Probenverdünner.
2 Fläschchen	BUF WASH	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). Jedes Fläschchen auf 1 Liter auffüllen.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Eindeckmittel. Nicht einfrieren. 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)
1 x 12	COVER SLD	Deckgläschen 1 box (1114), 2 boxes (1114-96)

Optionale Bestandteile

1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC *	Anti-human-IgG-FITC-Konjugat. Vor Licht schützen.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC PA *	Anti-human-IgG-FITC-Konjugat mit Evans-Blau (Primat aufgesogen). Vor Licht schützen. Verringert Hintergrundfluoreszenz auf Primatsubstrat
1 x 1,0 ml	EVANS	Evans-Blau-Gegenfärbung.

* Enthält <0,1% NaN₃

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

LOT	Chargennummer
REF	Bestellnummer
	Verwendbar bis
	Lagerungstemperatur
	Gebrauchsanleitung lesen
IVD	In-vitro-Diagnostikum
	Hersteller
	Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Fluoreszenzmikroskop
- Mikropipette oder Pasteurpipette
- Serologische Pipetten
- Färbekasten (z.B. Coplin-Färbetrog)
- Kleine Probenröhrchen (z.B. 13 x 75 mm) und Röhrchenhalter
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- 1-Liter-Behälter
- Waschflasche
- Papiertücher
- Inkubationskammer

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Alle menschlichen Serumproben und Produkte menschlichen Ursprungs sollten unabhängig von ihrer Herkunft als potentiell gefährlich behandelt werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹⁵.

WARNUNG – Natriumazid (NaN_3) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer. Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben bei -20°C eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

Verfahren**Testmethode****A. Suchtest**

1. Verdünnen Sie jedes Patientenserum 1:2,5 mit dem mitgelieferten Probenverdünner (0,2 ml Serum + 0,3 ml Verdünner). Verdünnen Sie nicht die positiven und negativen Kontrollseren. Bewahren Sie die unverdünnten Seren auf, um die Antikörpertiter zu bestimmen, falls Suchtests positiv ausfallen.
2. Lassen Sie die Beutel mit den Substratobjektträgern 10-15 Minuten lang bei Raumtemperatur liegen. Entfernen Sie vorsichtig die Objektträger, ohne das Substrat zu berühren.
3. Kennzeichnen Sie die Objektträger und legen Sie sie in eine Inkubationskammer, die mit mit Wasser befeuchteten Papiertüchern ausgelegt ist, um das Austrocknen zu verhindern.
4. Drehen Sie das Tropffläschchen um und drücken Sie es vorsichtig, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) negatives Kontrollserum in Vertiefung 1 zu geben. Geben Sie auf gleiche Art 1 Tropfen positives Kontrollserum in Vertiefung 2. Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.
5. Verwenden Sie einen Mikropipette oder Pasteurpipette, um jeweils 1 Tropfen (etwa 50 µl) des verdünnten Patientenserums in die übrigen Vertiefungen zu geben. Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.
6. Verschließen Sie die Inkubationskammer und inkubieren Sie die Objektträger 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
7. Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und spülen Sie ihn vorsichtig mit einer Pipette mit etwa 10 ml PBS ab, oder spülen Sie den Objektträger in einem mit PBS gefüllten Becher. Verwenden Sie keine Waschflaschen. Geben Sie den Objektträger sofort in einen Coplin-Trog und waschen Sie ihn 10 Minuten lang. Wiederholen Sie diesen Vorgang mit allen anderen Objektträgern.
8. Entfernen Sie den/die Objektträger aus dem Coplin-Trog. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. Legen Sie den Objektträger in die Inkubationskammer. Drehen Sie sofort das Tropffläschchen mit dem Konjugat um und drücken Sie es vorsichtig, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) in jede Vertiefung zu geben.

9. Wiederholen Sie Schritte **7 und 8** für jeden Objektträger.
10. Verschließen Sie die Inkubationskammer wieder. Inkubieren Sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
11. Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und tauchen Sie ihn in einen Becher mit PBS, um das überschüssige Konjugat zu entfernen. Belassen Sie den/die Objektträger 10 Minuten lang in einem mit PBS gefüllten Färbekasten. Falls das optionale Konjugat ohne Gegenfärbung verwendet wird (siehe „Optionale Bestandteile“ im Abschnitt „Mitgelieferte Materialien“), können Sie der letzten Spülung 2-3 Tropfen Evans-Blau-Gegenfärbung hinzufügen. Wiederholen Sie den Vorgang mit den übrigen Objektträgern. ANMERKUNG: Unsachgemäßes Waschen kann zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führen.
12. Entfernen Sie einen Objektträger aus dem Färbekasten. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. **Fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt fort, während der Objektträger noch nass ist, um dessen Austrocknen zu verhindern.**
13. Bringen Sie das Deckgläschen an, indem Sie **3 Tropfen** Eindeckmittel gleichmäßig auf das Deckgläschen auftragen und dieses auf den Objektträger legen. Üben Sie keinen übermäßigen Druck aus und verhindern Sie eine seitliche Bewegung des Deckgläschens.
14. Wiederholen Sie Schritte 12 und 13 für jeden Objektträger.
15. Untersuchen Sie die Objektträger auf eine spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200-facher Vergrößerung

Die Objektträger können sofort nach ihrer Vorbereitung abgelesen werden. Da das Eindeckmittel jedoch ein Mittel gegen das Verbleichen enthält, tritt kein signifikanter Verlust der Farbtintensität ein, wenn das Ablesen um bis zu 48 Stunden verzögert wird. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8 °C gelagert werden.

B. Endpunkt-Bestimmung (Titration)

Sie können ein im Suchtest positives Serum weiter testen, indem Sie Schritte 5 bis 13 befolgen, um den Titer zu bestimmen. Bei jedem Testlauf sollten die positiven und negativen Kontrollseren mitverwendet werden. Stellen Sie beginnend mit 1:2,5 eine verdoppelnde Verdünnungsreihe her. Der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion hervorruft, entspricht dem Titer.

Vorbereitung der Verdünnungsreihen

Nummerieren Sie vier Röhrchen von 1 bis 4. Geben Sie 0,4 ml gepufferten Verdünner in Röhrchen 1 und je 0,2 ml in Röhrchen 2 bis 4. Pipettieren Sie 0,2 ml unverdünntes Serum in Röhrchen 1 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie 0,2 ml von Röhrchen 1 in Röhrchen 2 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie nach dem Mischen weiterhin jeweils 0,2 ml von einem Röhrchen ins nächste, um die in der nachfolgenden Tabelle angezeigten Verdünnungen zu erhalten:

Röhrchen	1	2	3	4
Serum	0,1 ml +			
Gepufferter Verdünner	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Übertragung		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Endverdünnung	1:5	1:10	1:20	1:40 usw.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl das positive als auch das negative Kontrollserum mitverwendet werden. Das negative Kontrollserum sollte keine spezifische Fluoreszenz der Endomysiumschicht der glatten Muskelbündel zeigen. Das positive Kontrollserum hingegen sollte eine Farbtintensität der Tubuli dieser Strukturen von 2+ oder höher aufweisen.

Falls die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten werden, sollte der Testlauf wiederholt werden. Falls mit den Kontrollseren weiterhin unzureichende Ergebnisse erzielt werden, kann dies folgende Ursachen haben:

- Trübung. Verwerfen Sie das Kontrollserum und verwenden Sie ein neues.
- Probleme mit dem optischen System des Fluoreszenzmikroskops. Dazu können zählen: falsche Ausrichtung, die Lampe hat ihre Nutzungsdauer überschritten, usw.
- Der Objektträger ist während des Verfahrens ausgetrocknet.

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Tests auf endomysiale Antikörper sollten als negativ ($<2,5$), positiv (größer oder gleich 20) oder, vorzugsweise, als positiv mit Titer angegeben werden.

Kontrollieren Sie auf eine bestimmte Färbung der Endomysiumschicht der glatten Muskelbündel hin. **Siehe Foto 1.** Endomysiale Antikörper reagieren als ein Netz dünner, unregelmäßiger Linien rund um das Sarkolemm der einzelnen Fibrillen der glatten Muskulatur. Dies steht in starkem Kontrast zu Antikörpern gegen glatte Muskulatur, die mit dem Sarkoplasma reagieren. **Siehe Foto 2.**

Neben den Antikörpern gegen glatte Muskulatur (ASMA) zählen zu den anderen nachweisbaren Antikörper auch die antinukleären Antikörper (ANA). Es ist bekannt, dass das Vorhandensein von ASMA zu falschen negativen Ergebnissen für endomysiale Antikörper führen kann. Falls ASMA nachgewiesen werden, sollte die Probe mit einer höheren Verdünnung getestet werden¹. Eventuell auftretende ANA-Reaktionen gegen glattes Muskelgewebe sind normalerweise schwach und spärlich verteilt, und es ist daher unwahrscheinlich, dass sie falsche negative Ergebnisse verursachen.

Siehe Foto 1 und Foto 2 am Ende dieses Dokuments für Reaktionsbeispiele.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

In einigen Fällen können EMA-positive Seren bei der ersten Suchtestverdünnung entweder sehr schwach oder negativ sein (Prozonenphänomen). In solchen Zweifelsfällen sollten die Seren mit einer höheren Verdünnung getestet werden, und im Fall eines positiven Ergebnisses sollte der Antikörpertiter bestimmt werden.

Das Vorhandensein von zwei oder mehr Antikörpern in einem Serum, die mit demselben Gewebe reagieren, kann deren Nachweis mittels Immunfluoreszenz beeinträchtigen. Diese Beeinträchtigung kann entweder dazu führen, dass die EMA nicht nachgewiesen werden, oder dass ihr Titer unterdrückt wird, falls der Titer der interferierenden Antikörper höher als der Titer der EMA ist. Die häufigste Ursache für eine Beeinträchtigung bei EMA-Tests ist das gleichzeitige Vorhandensein von Antikörpern gegen glatte Muskulatur. Es wird empfohlen, dass Patientenserum, die auch ASMA enthalten, mit einer höheren Verdünnung erneut getestet werden. IgA-ASMA treten nicht häufig auf. ASMA der Klasse IgG blockieren IgA-EMA nicht, da erstere mit dem Sarkoplasma der glatten Muskelbündel reagieren und letztere mit dem Endomysium des die glatten Muskelbündel umgebenden Sarkolemm. Anti-Retikulin-Antikörper beeinträchtigen die Reaktion der EMA nicht, da sie nicht mit dem glatten Muskelgewebe von Primaten reagieren. Das gleichzeitige Vorhandensein von EMA der Klasse IgG kann den Nachweis von EMA der Klasse IgA beeinträchtigen. Dies ist jedoch selten der Fall, da:

1. EMA der Klasse IgG nur bei 25% von Patienten mit Zöliakie vorliegen,
2. die Titer der EMA der Klasse IgG normalerweise erheblich niedriger sind als die der IgA-EMA und
3. IgA-Antikörper normalerweise eine größere Avidität haben als IgG-Antikörper.

Bei einigen Patienten mit Zöliakie und IgA-Mangel liegen keine endomysialen Antikörper der Klasse IgA vor. Solche Patienten sind normalerweise positiv für EMA der Klasse IgG.

Zöliakiepatienten, die seit mehr als 9 Monaten eine glutenfreie Ernährung befolgen, sind ausnahmslos EMA-negativ.

Bei der Diagnosestellung müssen stets die Ergebnisse aller Labortests zusammen mit der gesamten klinischen Geschichte des Patienten bewertet werden.

ERWARTETE WERTE

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, sind auf glatter Muskulatur von Primaten nachgewiesene EMA hochspezifische Marker für Zöliakie und Dermatitis herpetiformis. Wie in Abb. 1 gezeigt, scheint das Vorhandensein von EMA sowohl bei Zöliakie als auch bei Dermatitis herpetiformis mit der Darmerkrankung in Verbindung zu stehen, und nicht mit den Hautläsionen bei DH.

LEISTUNGSMERKMALE

Der ImmuGlo™ Testkit für anti-endomysiale Antikörper (EMA), das ein Substrat aus glatter Muskulatur von Primaten und ein polyvalentes Konjugat anwendet, wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Kit verglichen, das ebenfalls ein polyvalentes Konjugat und Affenösophagus als Substrat verwendet. Der Vergleich wurde mit insgesamt 68 Seren durchgeführt: 20 von Patienten mit einem klinischen Verdacht auf Zöliakie und 48 normale Kontrollseren. Die Seren wurden gemäß den vom Hersteller empfohlenen Verfahren untersucht. Eine Suchtestverdünnung von 2,5 wurde verwendet, und alle EMA-positiven Seren wurden bis zum Endpunkt titriert. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

		Immco™ EMA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Anderer EMA IFA	POS (+)	18	0	18
	NEG (-)	2	48	50
	TOT (=)	20	48	68

relative Spezifität: 97%
 relative Sensitivität: 100%
 relative Übereinstimmung: 96%

Système de test par anticorps anti-endomysial (EMA)

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF	1114	Test de détection des Anticorps Anti-endomysiaux (Muscle lisse de singe)	48 Tests
REF	1114-96	Test de détection des Anticorps Anti-endomysiaux (Muscle lisse de singe)	96 Tests
REF	2160	Test de détection des Anticorps Anti-endomysiaux (Muscle lisse de singe)	6 Puits

UTILISATION PRÉVUE

Test d'immunofluorescence indirecte pour la recherche qualitative et semi-quantitative d'anticorps anti-endomysial (EMA) dans le sérum humain servant de support dans le cours du diagnostic de la maladie cœliaque et de la dermatite herpétiforme.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les anticorps anti-endomysial (EMA), comme le signale la littérature scientifique, sont détectés à l'origine sur le muscle lisse d'œsophage du singe par immunofluorescence indirecte. La détection des EMA fournit une aide dans le diagnostic de l'entéropathie sensible au gluten, c'est-à-dire la *maladie cœliaque* (CD) et la *dermatite herpétiforme* (DH). Les patients atteints de ces deux maladies apparaissent dotés d'anticorps à l'endomysium, à la réticuline et à la gliadine¹⁻¹². Ces marqueurs sérologiques ont été récemment incorporés au sein des critères révisés pour le diagnostic de la maladie cœliaque par la Société européenne de gastroentérologie pédiatrique et de nutrition¹³. Parmi les différents marqueurs d'anticorps de la maladie cœliaque et de la dermatite herpétiforme, les EMA de la classe IgA semble être les marqueurs les plus sensibles et les plus spécifiques. Les EMA de la classe IgG se manifestent également quand les EMA de la classe IgA se présentent sous une concentration élevée ou chez les individus qui présentent un déficit en IgA. Une baisse rapide des niveaux d'EMA se manifeste lorsque l'on suit un régime exempt de gluten. Un test de provocation au gluten ou un arrêt du régime exempt de gluten conduisent à l'apparition ou à une augmentation des titres d'anticorps anti-endomysial. Les patients suivant un régime exempt de gluten depuis plus de 9 mois présentent des titres réduits ou négatifs d'EMA s'ils respectent les impératifs de leur régime^{1,6-8,10}.

PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Dans la méthode de l'immunofluorescence indirecte, le sérum du patient est incubé sur les sections du tissu pour permettre la liaison des anticorps au substrat. Tous les anticorps non liés sont éliminés par un rinçage. Les anticorps liés de la classe IgA et IgG sont détectés par incubation du substrat avec un conjugué d'anticorps à marquage fluorescéine pour l'IgG humain. Les réactions sont observées sous un microscope à fluorescence équipé de filtres appropriés. La présence d'EMA est démontrée par une fluorescence de couleur vert pomme du revêtement endomysial des faisceaux du muscle lisse. Le titre (la réciproque du nombre représentant la plus forte dilution pour laquelle une réaction positive est observée) de l'anticorps est ensuite déterminé en testant des dilutions en série¹⁴.

INFORMATION SUR LE PRODUIT

Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8°C. Les réactifs sont prêts à l'usage après un équilibrage à température ambiante.

Matériel fourni

ImmuGlo™ Anticorps Endomysiaux EMA

REF

 1114, 1114-96

8 x	SORB SLD 6	Lames 6 puits avec substrat d'œsophage de singe
16 x	SORB SLD 6	Lames 6 puits avec substrat d'œsophage de singe (1114-96)
1 x 0.5 ml	CONTROL + EMA *	Contrôle positif EMA. Contient sérum humain.

1 x 0.5 ml **CONTROL** - *

1 x 5 ml **IgA/IgG-CONJ** **FITC** **EB** *

1 x 60 ml **BUF** *

2 fioles **BUF** **WASH**

1 x 5.0 ml **MOUNTING** **MEDIUM** *

1 x 12 **COVER** **SLD**

Composants en option

1 x 5 ml **IgA/IgG-CONJ** **FITC** *

1 x 5 ml **IgG-CONJ** **FITC** **PA** *

1 x 1.0 ml **EVANS**

* Contient < 0.1% NaN₃

Symboles utilisés sur les étiquettes:

LOT Numéro de lot

REF Numéro de référence catalogue



A utiliser avant



Température de conservation



Lire les instructions d'utilisation

IVD Pour usage diagnostique In vitro



Fabricant



Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Boîte de coloration (p. ex. Tube de Coplin)
- Petites éprouvettes (par exemple 13 x 75 mm) et râtelier d'éprouvettes de test
- Eau distillé ou désionisée
- récipient de 1 litre
- Flacon-laveur
- Serviettes de papier absorbant
- Chambre d'incubation

Contrôle négatif. Contient sérum humain.

Conjugué FITC anti-IgG humaines. Contient coloration d'Evans. **Maintenir à l'abri de la lumière.** 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)

Diluant sérum.

Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre.

Milieu de montage. Ne pas congeler. 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)

Lamelles couvre-lames. 1 box (1114), 2 boxes (1114-96)

Conjugué anti-IgG hum. FITC. Maintenir à l'abri de la lumière.

Conjugué FITC anti-IgG humaines avec Bleu d'Evans (Primat absorbé). Maintenir à l'abri de la lumière. Il réduit la fluorescence non spécifique sur le substrat de primat.

Contre-colorant Bleu d'Evans

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Destiné à un usage diagnostique in vitro Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Tous les échantillons de sérum humain et les substances dérivées de l'être humain devraient être traités comme étant potentiellement dangereux, sans égard pour leur origine. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux¹⁵.

AVERTISSEMENT – L'azide de sodium (NaN_3) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue de Immco Diagnostics Inc. Ne pas utiliser après l'expiration de la date de péremption.

RÉCOLTE DES SPÉCIMENS ET MANIPULATION

Seuls des échantillons de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des échantillons grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les échantillons à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les échantillons de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROCÉDURE

Méthode de test

A. Dépistage

1. Diluer chaque échantillon patient 1:2.5 avec la solution de dilution fournie (0,2 ml sérum + 0,3 ml diluant). Ne pas diluer les régulateurs positif ou négatif. Conserver du sérum non dilué pour déterminer des titres d'anticorps si les tests de dépistage apparaissent être positifs.
2. Laisser les sachets qui contiennent les lames de substrat atteindre la température ambiante pendant 10-15 minutes. Retirer avec soin les lames sans toucher le substrat.
3. Étiqueter les lames et les placer dans une chambre d'incubation entourée de serviettes en papier humidifiées avec de l'eau pour empêcher le séchage.
4. Renverser la fiole compte-gouttes et appuyer doucement pour appliquer 1 goutte (approximativement 50 µl de régulateur négatif) au puits #1. De la même façon, appliquer 1 goutte de régulateur positif au puits #2. Éviter de faire déborder les puits.
5. En utilisant une micropipette ou une pipette Pasteur, appliquer 1 goutte de sérum de patient dilué (approximativement 50 µl) aux autres puits. Éviter de faire déborder les puits.
6. Placer le couvercle sur la chambre d'incubation et incuber les lames pendant 30 minutes à température ambiante.
7. Retirer une lame de la chambre d'incubation. Tenir la lame par l'extrémité et rincer doucement avec approximativement 10 ml de PBS en utilisant une pipette, ou rincer la lame dans un vase à bec rempli de PBS. Ne pas utiliser de flacon-laveur. Transférer immédiatement la lame dans le tube de Coplin et laver pendant 10 minutes. Refaire le même processus avec toutes les lames restantes.
8. Enlever les lame(s) du tube de Coplin. Sécher le bord de la lame sur une serviette en papier pour enlever le PBS en excédent. Placer la lame dans la chambre d'incubation. Renverser immédiatement la fiole compte-gouttes de conjugué et appuyer doucement pour appliquer 1 goutte (approximativement 50 µl) à chaque puits.

9. Recommencer les étapes **7 et 8** pour chaque diapositive.
10. Remettre le couvercle sur la chambre d'incubation. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
11. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, plonger la lame dans un becher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration rempli de PBS pendant 10 minutes. Si un supplément de conjugué sans contre-coloration est utilisé (voir composé en option dans la Section Matériel Fourni), 2-3 gouttes de contre-coloration bleue d'Evans peuvent être ajoutée au lavage final. Répéter les opérations avec toutes les lames. REMARQUE: Un lavage incorrect peut augmenter le bruit de fond de fluorescence.
12. Retirer une lame de la boîte de coloration. Sécher le bord de la lame sur une serviette en papier pour enlever le PBS en excédent **Pour empêcher le séchage de la lame, poursuivre immédiatement en réalisant l'étape suivante pendant que la lame est encore mouillée.**
13. Monter la lamelle de protection en appliquant 3 gouttes de milieu de montage sur la lamelle de protection et placer la lamelle de protection sur la lame. Éviter d'exercer une pression indue et éviter tout mouvement latéral de la lamelle de protection.
14. Recommencer les étapes 12 et 13 pour chaque lame.
15. Rechercher la fluorescence spécifique sous un microscope à fluorescence avec un grossissement de 200x ou supérieur.

Les lames peuvent être lues dès qu'elles sont préparées. Cependant, en raison de la présence d'un agent antifading dans le milieu de montage, aucune perte significative de l'intensité de la coloration ne se produit si la lecture est effectuée après plus de 48 heures. Les lames doivent être stockées à l'obscurité à 2-8°C.

B. Détermination du critère d'évaluation (titrage)

Un sérum positif dans le test de dépistage peut être testé davantage en suivant les étapes 5 à 13 pour déterminer le titre. Chaque passage du test doit inclure les régulateurs positifs et négatifs. Faire des dilutions en double en série qui commencent à 1:2.5. La réciproque du nombre de la dilution la plus forte produisant une réaction positive correspond au titre.

Préparation des dilutions en série

Numéroter quatre éprouvettes de 1 à 4. Ajouter 0,4 ml de diluant d'échantillon à l'éprouvette 1 et 0,2 ml aux éprouvettes de 2 à 4. Pipeter 0,2 ml de sérum non dilué dans l'éprouvette 1 et mélanger soigneusement. Transférer 0,2 ml du tube 1 au tube 2 et mélanger soigneusement. Continuer à transférer 0,2 ml d'une éprouvette à l'autre après avoir mélangé pour produire les dilutions figurant dans le tableau suivant :

Éprouvettes	1	2	3	4
Sérum	0,1 ml +			
Solution de dilution	0,4 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Transfer		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Dilution finale	1:5	1:10	1:20	1:40 etc.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un régulateur positif et un régulateur négatif doivent être inclus à chaque étape du test. Le régulateur négatif ne doit pas présenter de fluorescence spécifique du revêtement de l'endomysium des faisceaux de muscles lisses, alors que le régulateur positif doit présenter une intensité de coloration 2+ ou supérieure des tubules de ces structures.

Si les résultats attendus ne sont pas obtenus, l'opération doit être recommencée. Si des résultats inadéquats continuent à se manifester avec les régulateurs, cela peut être dû à :

- Turbidité. Jeter et utiliser un autre contrôle
- Problèmes avec le système optique du microscope à fluorescence. Ceux-ci peuvent comprendre : alignement incorrect, ampoule au-delà de sa durée de vie prévue, etc.,
- Permettre à la lame de sécher pendant la procédure.

RÉSULTATS

Les résultats des tests pour les anticorps anti-endomysial doivent être rapportés comme étant négatifs ($< 2,5$), positifs (supérieur ou égal à 20) ou préférentiellement, positifs avec titre.

Lire la coloration spécifique du revêtement de l'endomysium des faisceaux de muscles lisses. **Voir la Photo 1.** Les anticorps anti-endomysial réagissent comme un réseau de lignes minces, irrégulières autour du sarcolemme des fibrilles du muscle lisse individuel. Ceci est en net contraste avec les anticorps anti-muscle lisse qui réagissent avec le sarcoplasme. **Voir Photo 2.**

D'autres anticorps détectables en plus des anticorps anti-muscle lisse (ASMA) comprennent les anticorps antinucléaires (ANA). On sait que la présence d'ASMA pour provoquer de faux résultats négatifs pour les anticorps anti-endomysial. Si des ASMA sont détectés, alors l'échantillon doit être testé à des dilutions plus élevées¹. Les réactions ANA sur les tissus du muscle lisse, quand elles se produisent, sont habituellement faibles et peu distribuées et, par conséquent, peu en mesure d'engendrer de faux résultats négatifs.

Consulter les photos 1 2 à la fin du présent document pour consulter des réactions d'exemple.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Dans certains cas, le sérum positif pour les EMA peut être très faible ou négatif à la dilution de dépistage initiale (phénomène de prozone). Dans de tels cas douteux, le sérum doit être testé à des dilutions plus élevées et, s'il est positif, le titre de l'anticorps doit être déterminé.

La présence de deux ou plusieurs anticorps dans un sérum qui est réactif avec le même tissu peut provoquer une interférence pour leur détection par immunofluorescence. Cette interférence peut causer soit l'absence de détection des EMA soit une suppression de son titre si l'anticorps en interférence présente un titre plus élevé qu'EMA. La cause la plus commune du phénomène d'interférence dans les tests d'EMA est la coexistence d'anticorps du muscle lisse. Il est recommandé que le sérum des patients qui contient aussi des ASMA soit testé davantage à des dilutions plus élevées. Des ASMA de la classe IgA ne sont pas très fréquents. Les anticorps ASMA de la classe IgG ne bloquent pas les anticorps anti-endomysial EMA-IgG dans la mesure où les premiers réagissent avec le sarcoplasme des faisceaux du muscle lisse et les seconds réagissent avec l'endomysium du sarcolemme autour des faisceaux du muscle lisse. Les anticorps anti-réticuline n'entrent pas en interférence avec la réaction des anticorps EMA parce qu'ils ne réagissent pas avec le tissu du muscle lisse du primate. La coexistence d'anticorps EMA de la classe IgG peut rentrer en interférence avec la détection des anticorps de la classe IgA. Cependant, cela se produit rarement dans la mesure où :

1. Les anticorps EMA de la classe IgG sont présents chez seulement 25% des patients atteints de maladie cœliaque,
2. Les titres des EMA de la classe IgG sont habituellement de loin inférieurs aux titres des EMA de la classe IgA et
3. les anticorps IgA présentent généralement une avidité plus élevée que les autres anticorps IgG.

Chez certains patients souffrant de maladie cœliaque et de déficience en IgA, les anticorps anti-endomysial de la classe IgA sont absents. Cependant, ces patients sont habituellement positifs pour les EMA de la classe IgG.

Les patients présentant une maladie cœliaque, qui suivent un régime exempt de gluten pendant plus de 9 mois sont invariablement négatifs aux EMA.

Quand on pose un diagnostic, les résultats de tout test de laboratoire doivent toujours être évalués sur la base du passé clinique global du patient.

VALEURS ATTENDUES

Comme on le voit dans le tableau 1, les anticorps EMA, détectés sur le muscle lisse du primate, sont des marqueurs très spécifiques de la maladie cœliaque et de la dermatite herpétiforme. La présence d'EMA semble être en

rapport avec la pathologie intestinale aussi bien dans la maladie cœliaque et dans la dermatite herpétiforme plutôt qu'avec les lésions de la peau de cette dernière, comme on le voit dans la Figure 1.

DONNÉES DE RENDEMENT

Le kit de test des anticorps anti-endomysial (EMA) Immuglo™ (EAM), en utilisant un substrat de muscle lisse de primate et un conjugué polyvalent, a été comparé avec un autre équipement qui est disponible dans le commerce, lequel utilise aussi un conjugué polyvalent et l'œsophage de singe en guise de substrat. La comparaison a porté sur un total de 68 sérums : 20 provenant de patients présentant une maladie cœliaque cliniquement suspectée et 48 provenant de contrôles normaux. Ces sérums ont été testés d'après la procédure recommandée par le fabricant. Une dilution de dépistage de 2,5 a été utilisée et tout le sérum positif aux EMA a été titré au critère d'évaluation. Les résultats sont les suivants :

		Immco™ EMA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Autre EMA IFA	POS (+)	18	0	18
	NEG (-)	2	48	50
	TOT (=)	20	48	68

spécificité relative: 97%
sensibilité relative: 100%
concordance: 96%

Test anticorpi Anti-endomisio (EMA)

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1114 Anticorpi Anti-endomisio (muscolo liscio di scimmia) 48 Determinazioni

REF 1114-96 Anticorpi Anti-endomisio (muscolo liscio di scimmia) 96 Determinazioni

REF 2160 Anticorpi Anti-endomisio (muscolo liscio di scimmia) 6 Pozzetti

FINALITA' D'USO

Test di immunofluorescenza indiretta (IF) per la rilevazione qualitativa e semiquantitativa degli anticorpi anti-endomisio (EMA) nel siero umano come strumento di aiuto per la diagnosi della malattia celiaca e della dermatite erpetiforme.

Sommario e spiegazione del test

Gli anticorpi anti-endomisio (EMA), come descritto nella letteratura, si rilevano prevalentemente su muscolo liscio dell'esofago di scimmia per immunofluorescenza indiretta. L'individuazione degli EMA è di aiuto nella diagnosi dell'enteropatia glutine sensibile, o malattia celiaca (MC) e della dermatite erpetiforme (DH). I pazienti affetti da MC e DH presentano anticorpi anti-endomisio, -reticolina, -gliadina, e -transglutaminasi tissutale¹⁻¹². Questi marcatori sierologici sono stati incorporati nei criteri per la diagnosi della malattia celiaca dalla Società Europea di Gastroenterologia e Nutrizione Pediatrica¹³. Dei marcatori anticorpali per la MC e la DH, gli EMA di classe IgA sembrano essere il marcatore maggiormente sensibile e specifico. Gli EMA di classe IgG si riscontrano anche quando gli EMA di classe IgA sono presenti in titoli elevati o in individui con deficit di IgA. Una rapida diminuzione dei livelli degli EMA si ottiene con un regime di dieta priva di glutine. Un challenge del glutine o il mancato mantenimento di una dieta priva di glutine porta alla comparsa o ad un aumento dei titoli degli anticorpi anti-endomisio. I pazienti in regime di dieta priva di glutine per un periodo superiore a 9 mesi mostrano titoli EMA ridotti o negativi se si attengono alle prescrizioni nutrizionali previste^{1,6-8,10}.

PRINCIPI DELLE METODICHE

Il metodo di immunofluorescenza indiretta adottato in questo kit prevede che i sieri dei pazienti siano incubati su sezioni di tessuto per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Gli anticorpi non legati sono rimossi mediante lavaggio e quelli legati, di classe IgA e IgG sono rilevati per incubazione del substrato con coniugato di anti-immunoglobulina umana marcato con fluoresceina. Le reazioni si osservano per microscopia in fluorescenza usando filtri idonei. La presenza degli EMA è dimostrata da una fluorescenza verde mela dell'involucro endomisiale dei fasci del muscolo liscio. Il titolo (il valore reciproco della diluizione maggiore che produce una reazione positiva) dell'anticorpo viene poi determinato analizzando le diluizioni seriali¹⁴.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. E' necessario, prima dell'uso, portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.

Materiali forniti

Anticorpi Endomisiali EMA ImmuGlo™ **REF** 1114, 1114-96

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 48 determinazioni ciascuno.

8 x	SORB SLD 6	Vetrini da 6 pozzetti, substrato muscolo liscio.
16 x	SORB SLD 6	Vetrini da 6 pozzetti, substrato muscolo liscio. (1114-96)
1 x 0.5 ml	CONTROL + EMA *	Controllo Positivo EMA. Contiene siero umano.
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo. Contiene siero umano.
1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC EB *	Coniugato FITC polivalente anti-IgG/IgA umane con Blu di Evans. Proteggere dalla luce. 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)

1 x 60 ml **BUF** *2 fiale **BUF** **WASH**1 x 5.0 ml **MOUNTING** **MEDIUM** *1 x 12 **COVER** **SLD****Componenti opzionali**1 x 5 ml **IgA/IgG-CONJ** **FITC** *1 x 5 ml **IgG-CONJ** **FITC** **PA** *1 x 1.0 ml **EVANS*** Contiene < 0,1% NaN₃**Simboli usati sulle etichette:****LOT** Numero di lotto**REF** Numero catalogo

Scadenza



Temperatura di conservazione



Leggere le istruzioni per l'uso

IVD Uso diagnostico in vitro

Produttore



Numero di test

Materiali necessari ma non forniti

- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta Pasteur
- Pipette sierologiche
- Vaschetta per colorazione (ad es. vaschetta Coplin)
- Provette piccole per test (ad es. 13 x 75 mm) e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro.
- Flacone di lavaggio
- Salviette di carta
- Camera umida per l'incubazione

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia i derivati del sangue umano e i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali¹⁵.

Diluyente Campione

Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). Da ricostituire a 1 litro.

Liquido di montaggio. Non congelare. 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)

Vetrini coprioggetto. 1 box (1114), 2 boxes (1114-96)

Coniugato FITC anti-IgG umane. Proteggere dalla luce.

Coniugato FITC anti-IgG umane. Colorante di contrasto Blu di Evans (il primate ha assorbito). Proteggere dalla luce. Riduce la fluorescenza della priorità bassa sul substrato del primate. Tenere lontano dalla luce.

Colorante di contrasto Blu di Evans.

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN_3) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

Per questa procedura usare unicamente campioni di siero. I campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati a -20°C. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

PROCEDURA

Metodo del test

A. Screening

1. Diluire il siero del paziente 1:2,5 con il Diluente per Campioni fornito (0,2 ml di siero + 0,3 ml di diluente). Non diluire i Controlli Positivi o Negativi. Conservare il siero non diluito per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che le buste contenenti i vetrini raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti. Rimuovere con attenzione il vetrino senza venire in contatto con il substrato.
3. Contrassegnare i vetrini e disporli nella camera umida sul cui piano interno saranno state poste delle salviette di carta inumidite con acqua per prevenire l'essiccazione.
4. Applicare 1 goccia (circa 50 µl) di Controllo Negativo nel pozzetto #1. Allo stesso modo applicare 1 goccia di Controllo Positivo nel pozzetto #2. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Usando una micropipetta o pipetta Pasteur, applicare 1 goccia di siero diluito del paziente (circa 50 µl) negli altri pozzetti. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
6. Posizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
7. Rimuovere il vetrino dalla camera umida, reggerlo per l'estremità e irrorare delicatamente con circa 10 ml di PBS usando una pipetta, oppure sciacquare il vetrino in un recipiente contenente PBS. Non usare flaconi di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino in una vaschetta Coplin di lavaggio e attendere per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
8. Rimuovere il/i vetrino/i dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. Posizionare il vetrino nella camera umida. Applicare immediatamente 1 goccia (circa 50 µl) di Coniugato in ciascun pozzetto.
9. Ripetere le fasi **7 e 8** per ciascun vetrino.
10. Riposizionare il coperchio sulla camera umida, e incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
11. Rimuovere il vetrino dalla camera umida, reggerlo per l'estremità e immergerlo in un recipiente contenente PBS per rimuovere il coniugato in eccesso. Lasciare il/i vetrino/i per 10 minuti in una vaschetta Coplin riempita con PBS. Nel caso venga usato un coniugato opzionale, privo di colorante di contrasto (vedere componenti opzionali nella sezione Materiali Forniti), possono essere aggiunte 2-3 gocce di Blu di Evans nel lavaggio finale. Ripetere la procedura per i restanti vetrini. **NOTA:** Un lavaggio inadeguato può causare un aumento nella fluorescenza di fondo.
12. Rimuovere il vetrino dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. **Per prevenire l'essiccazione, procedere immediatamente alla fase successiva mentre il vetrino è ancora umido.**
13. Montare il vetrino coprioggetto applicando **3 gocce** di liquido di montaggio uniformemente sul coprioggetto e posizionarlo sopra il vetrino. Evitare di esercitare una pressione eccessiva e gli spostamenti laterali del vetrino coprioggetto.

14. Ripetere le fasi 12 e 13 per ciascun vetrino.

15. Esaminare la fluorescenza specifica mediante microscopia a fluorescenza con ingrandimento 200x o superiore.

I vetrini possono essere letti appena montati. Tuttavia, per la presenza di un agente antiscolorimento nel liquido di montaggio, non si verificano perdite significative di intensità di colorazione e la lettura può essere effettuata nelle 48 ore successive alla preparazione. I vetrini devono essere conservati in assenza di luce a 2-8°C.

B. Determinazione Endpoint (titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere analizzato ulteriormente ripetendo le fasi da 5 a 13 per determinare il titolo anticorpale. Ogni serie di test deve includere Controlli Positivi e Negativi. Effettuare diluizioni seriali doppie a partire da 1:2,5. Il reciproco della più alta diluizione eseguita a cui il campione mostra positività è il valore del titolo.

Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare 4 provette da 1 a 4. Aggiungere 0,4 ml di Diluente del Campione nella provetta 1 e 0,2 ml nelle provette da 2 a 4. Pipettare 0,2 ml di siero non diluito nella provetta 1 e mescolare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta alla successiva, dopo la miscelazione, per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

Provette	1	2	3	4
Siero	0,1 ml +			
Diluente	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Tamponato				
Trasferimento		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluizione finale	1:5	1:10	1:20	1:40 etc.

CONTROLLO DI QUALITÀ

In ogni serie di test dovrebbero essere inclusi un Controllo Positivo e un Controllo Negativo. Il Controllo Negativo non dovrebbe evidenziare fluorescenza specifica dell'involucro endomisiale dei fasci del muscolo liscio, mentre Il Controllo Positivo dovrebbe produrre una colorazione dei tubuli di queste strutture con intensità di 2+ o maggiore.

Se non si ottengono i risultati attesi, la procedura dovrebbe essere ripetuta. Se i controlli continuano a produrre risultati discordanti, ciò può essere dovuto a:

- Torbidità. Smaltire e usare un nuovo controllo.
- Problemi legati al sistema ottico del microscopio a fluorescenza: allineamento non idoneo, lampada oltre la durata utile prevista, ecc.
- Aver lasciato asciugare il vetrino durante la procedura.

RISULTATI

I risultati dei test per gli anticorpi anti-endomisio dovrebbero essere riportati come negativi con titolo inferiore a 2,5, positivi con titolo superiore o uguale a 20 o, preferibilmente, positivi con relativo titolo.

Per osservare la colorazione specifica dell'involucro endomisiale dei fasci del muscolo liscio, **vedere Foto 1**. Gli anticorpi anti-endomisio reagiscono producendo una rete di sottili linee irregolari intorno al sarcolemma delle singole fibrille del muscolo liscio. Ciò è in netto contrasto con i pattern degli anticorpi anti-muscolo liscio che reagiscono con il sarcoplasma. **Vedere Foto 2**.

Altri anticorpi rilevabili, oltre agli anticorpi anti-muscolo liscio (ASMA), includono gli anticorpi anti-nucleari (ANA). È noto che la presenza degli ASMA può causare risultati falso negativi per gli anticorpi anti-endomisio. Se viene rilevata la presenza degli ASMA, il campione dovrebbe essere testato a diluizioni maggiori¹. Le reazioni ANA sul

muscolo liscio, se hanno luogo, sono normalmente deboli e con distribuzione spaziata, è pertanto poco probabile che provochino risultati falsi negativi.

Consultare le foto 1 e 2 alla fine di questo foglio per esempi di reazioni.

LIMITAZIONI DEL TEST

In alcuni casi, i sieri positivi per gli EMA possono essere o molto deboli o negativi alla diluizione iniziale di screening (fenomeno prozona). In questi casi incerti, i sieri dovrebbero essere analizzati a diluizioni maggiori e, se positivi, dovranno essere determinati i titoli anticorpali.

Nel caso in cui in un siero siano presenti due o più anticorpi reattivi con lo stesso substrato, può verificarsi un'interferenza nel rilevamento per immunofluorescenza. L'interferenza può risultare in mancata individuazione degli EMA o in soppressione del titolo se l'anticorpo interferente ha un titolo più alto di quello degli EMA. La causa più comune del fenomeno di interferenza nei test EMA è la coesistenza degli anticorpi anti-muscolo liscio. Si raccomanda di testare ulteriormente a diluizioni maggiori i sieri dei pazienti che contengono ASMA. L'incidenza di ASMA di classe IgA non è comune. Gli ASMA di classe IgG non bloccano gli EMA-IgA in quanto i primi reagiscono con il sarcoplasma dei fasci del muscolo liscio e gli ultimi con l'endomizio del sarcolemma che circonda i fasci del muscolo liscio. Gli anticorpi anti-reticolina non interferiscono con la reazione degli EMA dato che non reagiscono con il muscolo liscio di scimmia. La coesistenza degli EMA di classe IgG può interferire con la rilevazione degli EMA di classe IgA. Questo fenomeno si verifica comunque raramente in quanto:

1. gli EMA di classe IgG sono presenti unicamente nel 25% dei pazienti celiaci.
2. I titoli EMA di classe IgA sono solitamente molto più bassi dei titoli EMA di classe IgG.
3. gli anticorpi IgA sono spesso di maggiore avidità rispetto agli anticorpi IgG.

In alcuni pazienti con malattia celiaca e deficit di IgA, gli anticorpi anti-endomizio di classe IgA sono assenti. Tuttavia, tali pazienti risultano generalmente positivi per gli EMA della classe IgG.

I pazienti celiaci in regime di dieta priva di glutine per un periodo superiore a 9 mesi risultano invariabilmente negativi agli EMA.

Per la formulazione della diagnosi, i medici dovrebbero valutare i risultati di tutti i test di laboratorio insieme alla storia clinica completa del paziente.

VALORI ATTESI

Come si può vedere dalla Tabella 1, gli EMA rilevati su muscolo liscio di scimmia sono marcatori altamente specifici per la celiachia e per la dermatite erpetiforme. La presenza degli EMA sembra essere correlata alla patologia intestinale sia nel caso della celiachia che della dermatite erpetiforme, piuttosto che alle lesioni cutanee causate dalla DH, come illustrato nella Figura 1.

Caratteristiche di PERFORMANCE

Il Test per gli Anticorpi Anti-endomizio (EMA) ImmuGlo™, che usa come substrato muscolo liscio di scimmia e un coniugato polivalente, è stato confrontato con un test analogo disponibile in commercio che usa un coniugato polivalente e esofago di scimmia come substrato. La comparazione ha incluso un totale di 68 campioni di siero: 20 da pazienti con sospetta malattia celiaca e 48 da controlli normali. Questi sieri sono stati testati secondo la procedura raccomandata dal produttore. È stata usata una diluizione di screening di 2,5 e tutti i sieri positivi agli EMA sono stati titolati all'endpoint. I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono:

		EMA ImmuGlo™		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Altro IFA EMA	POS (+)	18	0	18
	NEG (-)	2	48	50
	TOT (=)	20	48	68

Specificità: 97%
Sensibilità: 100%
Concordanza: 96%

Sistema de Teste de Anticorpos Anti-Endomisiais (EMA)

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF	1114	Teste de anticorpos anti-endomisiais (músculo liso de primata)	48 Determinações
REF	1114-96	Teste de anticorpos anti-endomisiais (músculo liso de primata)	96 Determinações
REF	2160	Teste de anticorpos anti-endomisiais (músculo liso de primata)	6 Poços

APLICAÇÃO

É um teste de anticorpos por imunofluorescência indirecta para a detecção qualitativa e semiquantitativa de anticorpos anti-endomisiais (EMA) em soro humano como auxílio no diagnóstico da doença celíaca e da dermatite herpetiforme.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos anti-endomisiais (EMA), como descrito na literatura, são detectados principalmente nos músculos lisos do esófago do macaco por imunofluorescência indirecta. A detecção de EMA auxilia o diagnóstico de *enteropatia sensível ao glúten*, por exemplo a *doença celíaca* (DC) e a *dermatite herpetiforme* (DH). Os doentes com DC e DH apresentam anticorpos contra o endomísio, reticulina e gliadina¹⁻¹². Estes marcadores serológicos foram recentemente incorporados nos critérios revistos para o diagnóstico de DC pela Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica¹³. Dos diversos marcadores de anticorpos da DC e DH, o EMA da classe IgA parece ser o marcador mais sensível e específico. O EMA da classe IgG também se apresenta quando os EMA da classe IgA se encontram em maior título ou em indivíduos que têm deficiência de IgA. Um decréscimo rápido dos níveis de EMA ocorre com o seguimento de uma dieta sem glúten. Uma dieta com glúten ou o não cumprimento de uma dieta sem glúten podem levar ao aparecimento ou ao aumento de título de anticorpos anti-endomisiais. Os doentes em dieta sem glúten por mais de 9 meses reduziram ou anularam a concentração de EMA se seguirem as suas restrições de dieta^{1,6-8,10}.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

No método de imunofluorescência indirecta, o soro do doente é incubado em secções de tecido para permitir a ligação dos anticorpos ao substrato. Quaisquer anticorpos que não se tenham ligado são eliminados pela lavagem. Os anticorpos que se ligaram, da classe IgG, são detectados através da incubação do substrato com conjugado de imunoglobulina anti-humana marcado com fluoresceína. As reacções são observadas com um microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados. A presença de EMA é demonstrada por uma fluorescência verde-maçã do revestimento endomysial dos feixes de músculos lisos. O título (recíproco da maior diluição, que dá uma reacção positiva) do anticorpo é então determinado testando diversas diluições¹⁴.

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. Os reagentes estão prontos a usar depois de terem estabilizado à temperatura ambiente.

Materiais fornecidos

Anticorpos Anti-Endomisiais (EMA) ImmuGlo™

REF

 1114, 1114-96

8 x	SORB SLD 6	Lâminas de substrato de músculo liso de primata com 6 poços
16 x	SORB SLD 6	Lâminas de substrato de músculo liso de primata com 6 poços (1114-96)
1 x 0.5 ml	CONTROL + EMA *	Controlo positivo para EMA. Contém soro humano.
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo. Contém soro humano.
1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC EB *	Conjugado anti-humano polivalente com FITC contendo azul de Evans. Proteger da luz. 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)

PT

1 x 60 ml **BUF** *

Diluyente de amostras.

2 frascos **BUF** **WASH**

Tampão fosfato salino (PBS). Dissolver cada frasco em 1 l.

1 x 5.0 ml **MOUNTING** **MEDIUM** *

Meio de montagem. Não congelar. 1 vial (1114), 2 vials (1114-96)

1 x 12 **COVER** **SLD**

Lamelas 1 box (1114), 2 boxes (1114-96)

Componentes opcionais

1 x 5 ml **IgA/IgG-CONJ** **FITC** *

Conjugado de IgG anti-humana com FITC. Proteger da luz.

1 x 5 ml **IgG-CONJ** **FITC** **PA** *

Conjugado de IgG anti-humana com FITC contendo azul de Evans (Primata absorvido). Proteger da luz. Reduz a fluorescência não específica na carcaça do primata.

1 x 1.0 ml **EVANS**

Contrastante azul de Evans.

* Contém < 0,1% NaN₃

Símbolos utilizados nos rótulos:

LOT Número de lote

REF Número de catálogo

 Prazo de validade

 Temperatura de armazenamento

 Ler as instruções de utilização

IVD Utilização em diagnóstico in vitro

 Fabricante

 Número de testes

Materiais necessários mas não fornecidos

- Microscópio de fluorescência
- Micropipeta ou pipeta de Pasteur
- Pipetas serológicas
- Recipiente de coloração (ex: Coplin)
- Tubos de ensaio limpos 13 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Água destilada ou desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco de lavagem
- Toalhetes de papel
- Câmara de incubação

AVISOS E PRECAUÇÕES

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados para HbsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram resultado negativo nos testes requeridos pela FDA. Todas as amostras

de soro humano e produtos de origem humana devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais¹⁵.

AVISO: A azida de sódio (NaN_3) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação dessas azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

As instruções devem ser seguidas à risca de forma a assegurar resultados válidos. Não troque os componentes dos kits com outros de outras origens diferentes do mesmo número de catálogo da Immco™. Não utilizar se estiverem fora do prazo de validade.

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Nestas operações só devem ser usadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios podem interferir no rendimento deste teste e não devem ser usadas. Conservar entre 2 e 8 °C por não mais de uma semana. Para uma conservação mais prolongada devem ser congeladas a -20 °C. Evitar repetidas congelações e descongelações.

PROCEDIMENTO

Método do teste

A. Controlo

1. Dilua cada soro do doente A 1:2,5 no Diluente da Amostra fornecido (0,2 ml de soro + 0,3 ml de Diluente). Não dilua os Controlos Negativo e Positivo. Conserve o soro não diluído para determinar a titulação de anticorpos, se os testes de controlo forem positivos.
2. Deixe que as bolsas com as lâminas de substrato estabilizem à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. Retire as lâminas com atenção sem tocar no substrato.
3. Rotule as lâminas e coloque-as na câmara de incubação revestida com toalhetes de papel humedecidos com água para evitar a secagem.
4. Inverta o frasco conta-gotas e aperte ligeiramente para aplicar 1 gota (cerca de 50 µl) de Controlo Negativo no poço n.º 1. Do mesmo modo, deite 1 gota de Controlo Positivo na poço n.º 2. Não encha demasiado.
5. Com uma micropipeta ou pipeta de Pasteur, deite 1 gota do soro diluído do doente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demasiado os poços.
6. Coloque a tampa na câmara de incubação e incube as lâminas 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Retire a lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina pela extremidade e lave com cerca de 10 ml de PBS usando uma pipeta, ou lave a lâmina numa proveta com PBS. Não use o frasco de lavagem. Transfira imediatamente a lâmina para o recipiente de Coplin e lave 10 minutos. Repita a operação em todas as lâminas restantes.
8. Retire a(s) lâmina(s) do recipiente de Coplin. Passe o bordo da lâmina num toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS.
Coloque a lâmina na câmara de incubação. Inverta imediatamente o frasco com conta-gotas do Conjugado e aperte-o ligeiramente para deitar 1 gota (aproximadamente 50 µl) em cada poço.
9. Repita os passos 7 e 8 em cada lâmina
10. Coloque a tampa na câmara de incubação. Incube por 30 minutos à temperatura ambiente.
11. Retire uma lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina numa ponta e mergulhe-a num recipiente com PBS para eliminar o excesso de conjugado. Coloque a(s) lâmina(s) num recipiente de coloração com PBS durante 10 minutos. Se optar por usar conjugado sem contrastante (consultar componentes opcionais na secção Materiais fornecidos), poderá adicionar 2 a 3 gotas de contrastante azul de Evans à lavagem final. Repita nas lâminas restantes. **NOTA:** Uma lavagem deficiente pode levar a um aumento da fluorescência de fundo.
12. Retire a lâmina do recipiente de coloração. Passe a aresta da lâmina num toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS. **Para evitar que a lâmina seque, salte imediatamente ao passo seguinte enquanto a lâmina ainda está húmida.**

13. Monte a lamela aplicando **3 gotas** de Meio de Montagem, uniformemente na lamela e coloque-a sobre a lâmina. Não faça muita pressão e evite o deslizamento lateral da lamela.
14. Repita os passos 12 e 13 em cada lâmina.
15. Examine a fluorescência específica com microscópio de fluorescência com aumento de 200x ou mais.

As lâminas devem ser lidas assim que estiverem prontas. Contudo, devido à presença de um agente antidescoloração no meio de suporte, não há perdas significativas de intensidade de coloração, se a leitura for adiada até 48 horas. As lâminas devem ser conservadas às escuras entre 2 e 8 °C.

B. Determinação final (titulação)

Um soro positivo no teste de controlo pode ainda ser mais testado seguindo os passos 5 ao 13 para determinar o título. Cada teste deve incluir os Controlos Positivo e Negativo. Efectue diluições em série e em duplicado iniciando por 1:2,5. O recíproco da diluição maior que provoca uma reacção positiva é o título.

Preparação de diluições em série

Numere quatro tubos de 1 a 4. Deite 0,4 ml de Diluente Tampão no tubo 1 e 0,2 ml nos tubos 2 a 4. Pipete 0,2 ml de soro não diluído para o tubo 1 e mexa bem. Transfira 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e mexa bem. Continue a transferir 0,2 ml de um tubo para o outro após mexer para produzir as diluições descritas na tabela seguinte.

Tubos	1	2	3	4
Soro	0,1 ml			
	+			
Diluente tamponado	0,4 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		⇄	⇄	⇄
Transferir	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	
Diluição final	1:5	1:10	1:20	1:40 etc.

CONTROLO DE QUALIDADE

Os Controlos Positivo e Negativo devem ser incluídos em cada teste. O Controlo Negativo não deve mostrar fluorescência específica do revestimento endomísio dos feixes dos músculos lisos, no caso em que o Controlo Positivo tenha intensidade de coloração 2+ ou superior dos túbulos dessas estruturas.

Se não se obtiverem os resultados esperados, o teste deve ser repetido. Se resultados inadequados continuarem a ocorrer com os controlos, pode tratar-se de:

- Turvação. Elimine e use outro controlo.
- Problemas no sistema óptico do microscópio de fluorescência: Estes incluem: alinhamento incorrecto, lâmpada a precisar de ser mudada, etc.
- A lâmina ficou seca durante o processo.

RESULTADOS

Os resultados dos testes para anticorpos anti-endomisiais devem ser registados como negativos (< 2,5), positivo, (maior ou igual a 20) ou alternativamente positivo com titulação.

Leia a coloração específica do revestimento endomísio dos feixes de músculos lisos. **Veja a Fotografia 1.** Os anticorpos anti-endomisiais reagem como uma rede de linhas finas e irregulares em redor do sarcolema das fibras individuais dos músculos lisos. Isto contrasta fortemente com os anticorpos anti-músculo liso que reagem com o sarcoplasma. **Veja a Fotografia 2.**

Outros anticorpos detectáveis, para além dos anticorpos anti-músculo liso (ASMA), são os anticorpos anti-nucleares (ANA). A presença de ASMA é conhecida como causa de resultados falsos negativos de anticorpos anti-endomisiais. Se forem detectados ASMA, a amostra deverá ser testada em diluições superiores¹. As reacções de ANA no tecido muscular liso, quando ocorrem, são geralmente fracas e escassamente distribuídas e, por conseguinte, improvavelmente causadoras de resultados falsos negativos.

Veja a Fotografia 1 e a Fotografia 2, no fim deste documento, para reacções de exemplo.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Nalguns casos, o soro positivo para EMA poderá também ser muito fraco ou negativo no fenómeno pró-zona da diluição de controlo inicial. Nesses casos duvidosos o soro deve ser controlado em diluições mais elevadas e, se positivo, determinado o título dos anticorpos.

A presença de dois ou mais anticorpos num soro que sejam reactivos com o mesmo tecido pode provocar uma interferência na sua detecção por imunofluorescência. Esta interferência também pode provocar um erro na detecção de EMA ou uma supressão do seu título se o anticorpo de interferência tiver um título superior a EMA. A causa mais comum do fenómeno de interferência em testes EMA é a coexistência de anticorpos anti-músculo liso. Aconselha-se que o soro de doentes que também contenha ASMA seja testado em diluições superiores. Os ASMA da classe IgA não são uma ocorrência comum. Os ASMA da classe IgG não bloqueiam o EMA IgA porque os primeiros reagem com o sarcoplasma dos feixes de músculos lisos e os últimos reagem com o endomísio do sarcolema em redor dos feixes de músculos lisos. Os anticorpos anti-reticulina não interferem com a reacção de EMA porque não reagem com o tecido do músculo liso dos primatas. A coexistência de EMA da classe IgG pode interferir com a detecção de EMA da classe IgA. Todavia, isso acontece raramente pois:

1. Os EMA da classe IgG só estão presentes em 25% dos doentes com doença celíaca,
2. Os títulos de EMA da classe IgG são normalmente muito inferiores aos títulos EMA IgA e
3. Os anticorpos IgA têm normalmente maior avidéz que os anticorpos IgG.

Nalguns doentes com doença celíaca e deficiência de IgA, os anticorpos anti-endomisiais da classe IgA estão ausentes. Todavia, esses doentes são normalmente positivos a EMA da classe IgG.

Os doentes com doença celíaca em dieta sem glúten há mais de 9 meses são invariavelmente negativos a EMA.

Quando se efectua um diagnóstico, devem ser sempre avaliados os resultados de todos os testes laboratoriais em conjunto com o historial clínico do doente.

VALORES PREVISTOS

Como se pode observar na Tabela 1, os EMA, como detectados no músculo liso de primatas são marcadores altamente específicos da doença celíaca e da dermatite herpetiforme. A presença de EMA parece estar mais relacionada com a patologia intestinal, tanto na doença celíaca como na dermatite herpetiforme do que as lesões da pele na última, como descrito na Figura 1.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Kit de teste de Anticorpos Anti-Endomisiais (EMA) ImmuGlo™, utilizando substrato de músculo liso de primatas e um conjugado polivalente, foi comparado com outro kit obtido no comércio que também utiliza um conjugado polivalente e esófago de macaco como substrato. A comparação incluiu um total de 68 soros: 20 de doentes com suspeita clínica de doença celíaca e 48 de controlos normais. Os soros foram testados de acordo com o método aconselhado pelo fabricante. Foi usada uma diluição de despistagem de 2,5 e todos os soros positivos a EMA foram titulados no ponto final. Os resultados foram os seguintes:

		Immco™ EMA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Outro EMA IFA	POS (+)	18	0	18
	NEG (-)	2	48	50
	TOT (=)	20	48	68

especificidade relativa 97%

sensibilidade relativa: 100%

acordo relativo: 96%

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

- 1 Chorzelski TP, Beutner EH, Kumar V and Zalewski TK (Eds). Serologic Diagnosis of Celiac Disease. CRC Press Boca Raton; 1990.
- 2 Levenson SD, Austin RK, Dietler MD, Kasarda DD and Kagnoff MF. Specificity of antigliadin antibody in celiac disease. *Gastroenterology*; 1985, 89:1-5.
- 3 Tucker NT, Barghuthy FS, Prihoda TJ, Kumar V, Kerner A and Lebenthal E. Antigliadin antibodies detected by enzyme linked immunosorbent assay as a marker of childhood celiac disease. *J Pediatric*; 1988, 113:286-289.
- 4 Hallström O. Comparison of IgA-class reticulin and endomysium antibodies in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Gut*; 1989, 30:1225-1 232.
- 5 Khoshoo V, Bhan MK, Unsworth DJ, Kumar R and Walker-Smith A. Anti-reticulin antibodies: useful adjunct to histopathology in diagnosing celiac disease, especially in developing country. *J Pediatric Gastroenterol Nutr*; 1988, 7: 864-866.
- 6 Kapuscinska A, Zalewski T, Chorzelski TP, Sulez J, Beutner EH, Kumar R and Rossi T. Disease specificity and dynamics of changes in IgA class anti-endomysial antibodies in celiac disease. *J Pediatric Gastroenterol Nutr*; 1987, 6: 529-534.
- 7 Rossi TM, Kumar V, Lerner A et al. Relationship of endomysial antibodies to jejunal mucosal pathology: specificity towards both symptomatic and asymptomatic celiacs. *J Pediatric Gastroenterol Nutr*; 1988, 7: 858-863.
- 8 Kumar V, Lerner A, Valeski JE et al. Endomysial antibodies in the diagnosis of celiac disease and the effects of gluten on antibody titers. *Immun Invest*; 1989 18: 533-544.
- 9 Calabuig M, Torregosa R, Polo P, Tuset L et al. Serological markers and celiac disease: a new diagnostic approach. *J Paediatric Gastroenterol Nutr*; 1990, 10:435-442.
- 10 Karpati S, Bürgin-Wolff A, Krieg T, Maurer M et al. Binding to human jejunum of serum IgA antibody from children with coeliac disease. *Lancet*; 1990, 336: 1335-1338.
- 11 Kumar V, Hemedinger E, Chorzelski TP et al. Reticulin and endomysial antibodies in bullous disease - comparison of specificity and sensitivity. *Arch Dermatol*; 1987, 123: 1179-1182.
- 12 Peters MS and McEvoy MT. IgA antiendomysial antibodies in dermatitis herpetiformis. *J Am Acad Dermatol*; 1989, 21: 1225-1231.
13. Walker-Smith JA, Quandalini S, Schmitz J et al. Revised criteria for diagnosis of celiac disease. Report of working group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child*; 1990, 65:909-911.
14. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski Tp and Ku mar V, Eds, John Wiley and Sons New York; 1987, 3rd Ed, 3-40.
15. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1999 (HHS Pub. No. {CDC} 93-8395).

Photo 1. EMA staining reaction on primate smooth muscle, 200X. Note staining of lining of the smooth muscle bundles.

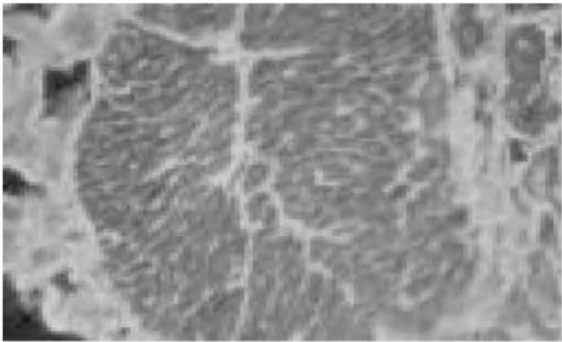


Photo 2. ASMA staining reaction on primate smooth muscle, 200X. Note staining of the smooth muscle sarcoplasm.

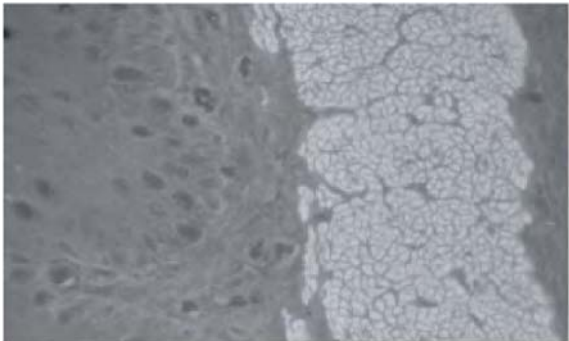
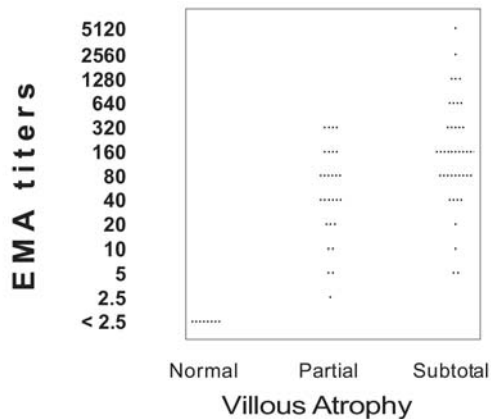


Figure 1: Correlation of IgA-EMA titers in Villous Atropy



From Chorzelski TP et al¹ and Kumar V et al⁸

Table 1. Incidence of IgA Class EMA

Clinical Condition	No. Tested	% Positive
Confirmed Celiacs		
On gluten	185	99
On gluten free diet	190	9
Suspected Celiacs		
On gluten	82	83
On gluten free diet	30	16
Dermatitis Herpetiformis (DH)	253	80
DH with Subtotal Villous Atrophy	42	100
DH on gluten free diet	36	3
Disease Controls (GI)		
Infectious Diarrhea	210	0
Recurrent Diarrhea	124	0
Toddlers Diarrhea	170	0
Milk Protein Intol.	69	0
Ulcerative Colitis	69	0
Crohn's Disease	65	0
Liver Diseases	21	0
Disease Controls (Skin)		
Linear IgA Bullous Dermatitis	4	0
Other Skin Diseases	180	0

Compiled from the literature as per Chorzelski TP et al¹.



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@immco.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