



ANTI-ENDOMYSIAL ANTIBODY (EMA) TEST (PRIMATE DISTAL ESOPHAGUS SECTIONS)

IVD For in vitro Diagnostic Use

PRODUCT INSERT

REF 1114A-PDE Anti-Endomysial Antibody (EMA) Test (Primate Distal Esophagus Sections) 48 Determinations

REF 1114G-PDE 48 Determinations

REF 1114A-PDE-250 250 Determinations

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

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 against endomysium, reticulin, gliadin and tissue transglutaminase¹⁻¹². These serological markers have been incorporated into the criteria for the diagnosis of CD by the European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition¹³. Endomysial antibodies (EMA) may be detected by indirect immunofluorescence on primate smooth muscle such as the distal esophagus substrate included in this kit. Of the various antibody markers for 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 or 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™ Anti-Endomysial Antibody (EMA) Test (Primate Distal Esophagus Sections)

REF 1114A-PDE, 1114A-PDE-250, 1114G-PDE

Kits contain sufficient reagents to perform 48 determinations each.

8 x	SORB SLD 6	6 well Primate Distal Esophagus Substrate Slides (REF 1114A-PDE, 1114G-PDE)
25 x	SORB SLD 10	10 well Primate Distal Esophagus Substrate Slides (REF 1114A-PDE250)
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-CONJ FITC EB	Anti-human IgA FITC Conjugate. Contains Evan's Blue Counterstain. Protect from light (REF 2 x 5ml 1114A-PDE250)
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB	Anti-human IgG FITC Conjugate. Contains Evan's Blue Counterstain.
1 x 60 ml	BUF	Buffered Diluent (REF 2 x 60ml 1114A-PDE250)
2 x	BUF WASH	Phosphate Bufferd Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter. (REF 3x 1114A-PDE250)
1 x 5.0 ml	MOUNT MEDIUM	Mounting Medium. Do not freeze. (REF 3x5ml 1114A-PDE250)
1 x 12	COVER SLD	Coverslips (REF 2 x 12 1114A-PDE250)
To order conjugate and counterstain as separate components, add an "X" at the end of the kit part number.		
1 x 5 ml	IgA-CONJ FITC	Anti-human IgA FITC Conjugate. Protect from light (REF 2 x 5ml 1114A-PDE250X)
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC	Anti-human IgG FITC Conjugate. Protect from light
1 x 1.0 ml	EVANS	Evan's Blue Counterstain+

Symbols used on labels:



Lot number



Catalog number



In vitro diagnostic use



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use



Number of tests



Manufacturer



Date of Manufacture



* Danger. May cause cancer. Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection. Store locked up. Dispose of contents/container to comply with local, state and federal regulations.

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, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁵.

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 Buffered 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 0.05 ml) 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

EN

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 0.05 ml) 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 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	0.2 ml			
	+			
Buffered Diluent	0.3 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Transfer		⇌ 0.2 ml	⇌ 0.2 ml	⇌ 0.2 ml
Final dilution	1:2.5	1:5	1:10	1:20 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.

EN RESULTS

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

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. Antireticulin antibodies do not interfere with the reaction of EMA because they do not react with primate smooth muscle tissue.

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 distal esophagus substrate and IgA conjugate, was compared with another commercially available kit for detection of EMA. 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:

EN

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

relative specificity: 97%

relative sensitivity: 100%

relative agreement: 96%

IVD Για in vitro διαγνωστική χρήση

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF	1114A-PDE Ανάλυση αντισωμάτων κατά του ενδομυΐου (EMA) (τομές άπω οισοφάγου πρωτευόντων) 48 Προσδιορισμοί
REF	1114A-PDE-250 250 Προσδιορισμοί
REF	1114G-PDE 48 Προσδιορισμοί

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

Η ανίχνευση αντισωμάτων EMA συμβάλλει στη διάγνωση της εντεροπάθειας από γλουτένη, δηλαδή της κοιλιοκάκης (KK) και της ερπητοειδούς δερματίτιδας (ΕΔ). Οι ασθενείς με KK και ΕΔ αναφέρεται ότι εμφανίζουν αντισώματα κατά του ενδομυΐου, της ρεϊκουλίνης, της γλιαδίνης και της ιστικής τρανσγλουταμινάσης¹⁻¹². Αυτοί οι ορολογικοί δείκτες έχουν ενσωματωθεί στα κριτήρια για τη διάγνωση της KK από την Ευρωπαϊκή Εταιρία Παιδιατρικής Γαστρεντερολογίας και Διατροφής¹³. Τα αντισώματα κατά του ενδομυΐου (EMA) μπορούν να ανιχνευθούν μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού σε λείο μυϊκό ιστό πρωτευόντων, όπως το υπόστρωμα άπω οισοφάγου που περιλαμβάνεται σε αυτό το kit. Από τα διάφορα αντισώματα δείκτες της KK και της ΕΔ, τα αντισώματα EMA τάξης IgA φαίνεται ότι αποτελούν τον πιο ευαίσθητο και ειδικό δείκτη. Τα 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 με μια δίαιτα ελεύθερη γλουτένης παρατηρείται 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 υπό δίαιτα ελεύθερης γλουτένης διάρκειας >9 μηνών έχουν μειωμένους ή αρνητικούς 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 αφαιρούνται με έκπλυση. Τα αντισώματα τάξης IgG ο IgA που έχουν δεσμευθεί ανιχνεύονται με την επώαση του υποστρώματος με συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης, το οποίο είναι σημασμένο με φλουροοσκεΐνη. Οι αντιδράσεις παρακολουθούνται με μικροσκόπιο φθορισμού που διαθέτει τα κατάλληλα φίλτρα. Η παρουσία αντισωμάτων EMA διαπιστώνεται με την παρουσία φθορισμού έντονου πράσινου χρώματος στις παρυφές των δεματίων των λείων μυϊκών ινών του ενδομυΐου. Στη συνέχεια καθορίζεται ο τίτλος του αντισώματος (το αντίστροφο της υψηλότερης αραιώσεως που έδωσε θετική αντίδραση) με ανάλυση διαδοχικών αραιώσεων¹⁴.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Φύλαξη και προετοιμασία

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

Υλικά που παρέχονται

Ανάλυση αντισωμάτων κατά του ενδομυΐου (EMA) (τομές άπω οισοφάγου πρωτευόντων) ImmuGlo™

REF 1114A-PDE, **REF** 1114A-PDE-250, **REF** 1114G-PDE

Κάθε kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 48 προσδιορισμών.

8 x

SORB **SLD** **6**

Αντικειμενοφόροι υποστρώματος άπω οισοφάγου πρωτευόντων με 6 κυψελίδες (1114A-PDE, 1114G-PDE)

EL

25 x

SORB	SLD	10
------	-----	----

Αντικειμενοφόροι υποστρώματος άπω οισοφάγου πρωτευόντων με 10 κυψελίδες (1114A-PDE250)

1 x 0,5 ml

CONTROL	+	EMA
---------	---	-----

Διάλυμα θετικού ελέγχου για EMA. Περιέχει ορό ανθρώπου.

1 x 0,5 ml

CONTROL	-
---------	---

Διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Περιέχει ορό ανθρώπου.

1 x 5 ml

IgA-CONJ	FITC	EB
----------	------	----

Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgA. Περιέχει επίχρωση Evans blue. **Να προστατεύεται από το φως.** (3x5ml-1114A-PDE250)

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC	EB
----------	------	----

Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgG. Περιέχει επίχρωση Evans blue. **Να προστατεύεται από το φως.**

1 x 60 ml

BUF

Ρυθμιστικό διάλυμα (2x60ml-1114A-PDE250)

2 x

BUF	WASH
-----	------

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Διαλύστε κάθε φιαλίδιο έως όγκο 1 λίτρου. (3x-1114A-PDE250)

1 x 5,0 ml

MOUNTING	MEDIUM
----------	--------

Μέσο επικάλυψης. Να μην καταψύχεται. (3x5ml-1114A-PDE250)

1 x 12

COVER	SLD
-------	-----

Καλυπτρίδες. (3x12-1114A-PDE250)

Για να διατάξετε την κλίση και counterstain ως χωριστά συστατικά, προσθέστε ένα "X" στο τέλος του αριθμού μερών εξαρτήσεων (1114A-PDEX)

Προαιρετικά συστατικά

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC
----------	------

Συζευκτικό αντίσωμα IgG κατά της ανθρώπινης με χρωστική Evans Blue. Να προστατεύεται από το φως (1114G-PDE)

EL

1 x 5 ml

IgA-CONJ FITC

Συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης IgA συζευγμένο με FITC. Να προστατεύεται από το φως. (3x5ml-1114A-PDE250X)

1 x 1.0 ml

EVANS

Επίχρωση Evans blue.*

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:



Αριθμός Παρτίδας



Αριθμός καταλόγου



Διαγνωστική χρήση in vitro



Χρήση έως



Θερμοκρασία αποθήκευσης



Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης



Αριθμός δοκιμών



Κατασκευαστής



Ημερομηνία κατασκευής



* Κίνδυνος. Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση. Μην το χρησιμοποιήσετε πριν διαβάσετε και κατανοήσετε τις οδηγίες προφύλαξης. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: Συμβουλευθείτε / Επισκεφθείτε γιατρό. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια / πρόσωπο. Φυλάσσεται κλειδωμένο. Φυλάσσεται κλειδωμένο. Διάθεση του περιεχομένου/περιέκτη στο εγκεκριμένο διάθεση αποβλήτων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Μικροσκόπιο φθορισμού
- Μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur
- Ορολογικές πιπέτες
- Τρυβλίο χρώσης (π.χ. δοχείο Coplin)
- Μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες (π.χ. 13 x 75 mm) και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων.
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Περιέκτης 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 τα προϊόντα ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα, ανεξάρτητα από την προέλευση τους. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έκχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹⁴.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ - Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) 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

EL

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 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλου 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 θερμοκρασίες 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. Ανάλυση διαλογής

1. Αραιώστε τον ορό κάθε ασθενούς σε αναλογία 1:2,5 με το αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται (0,2μl ορού + 0,3 ml αραιωτικό διάλυμα). Μην αραιώνετε τα διαλύματα θετικού ή αρνητικού ελέγχου. Φυλάξτε τους μη αραιωμένους 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 εμποτισμένο με νερό για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση.
4. Αναστρέψτε το σταγονόμετρο και πιέστετο 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 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 κύπελλο που περιέχει PBS. Μη 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 στο θάλαμο επώασης. Αναστρέψτε αμέσως το σταγονόμετρο του συζευκτικού αντισώματος και πιέστε μαλακά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl) 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 δίσκο χρώσης. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. Για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση της αντικειμενοφόρου, προχωρήστε αμέσως στο επόμενο βήμα, ενόσω η αντικειμενοφόρος είναι ακόμη υγρή.
13. Εφαρμόστε την καλυπτρίδα, προσθέτοντας 3 σταγόνες μέσου επικάλυψης ομοιόμορφα επάνω στην καλυπτρίδα και τοποθετήστε την πάνω από την 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 μικροσκοπιο 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 η ανάγνωση καθυστερήσει έως και 48 ώρες. Οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να φυλάσσονται σε σκοτεινό χώρο, σε θερμοκρασία 2-8°C.

B. Προσδιορισμός τελικού σημείου (πιπλοδότηση)

Ένα ορός που βρέθηκε θετικός στην ανάλυση διαλογής μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω ακολουθώντας τα βήματα 5 έως 13 για να προσδιοριστεί 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 έξι σωληνάρια από το 1 έως το 6. Προσθέστε 0,9 ml διαλύματος αραιώσης δειγμάτων στο σωληνάριο 1

EL

και 0,2 ml στα σωληνάρια 2 έως 4. Μεταφέρετε με πιπέτα 0,1 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 διάλυμα	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Μεταφορά		↗	↗	↗
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 δεν θα πρέπει να παρουσιάζει ειδικό φθορισμό του κινητοπλάστη. Το διάλυμα θετικού ελέγχου θα πρέπει να παρουσιάζει 2+ ή μεγαλύτερη ένταση χρώσης της δομής αυτής.

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 ενδομυϊού θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά (με τίτλο χαμηλότερο από 2,5), θετικά (με τίτλο υψηλότερο από ή ίσο με 20) ή κατά προτίμηση, θετικά με ειδικό τίτλο τελικού σημείου.

Εξετάστε για ειδική χρώση του ενδομυϊκού περιβλήματος των δερμάτων των λείων μυϊκών ινών. **Βλ. φωτογραφία 1.** Τα αντισώματα κατά του ενδομυϊού αντιδρούν ως δίκτυο λεπτών, ακανόνιστων γραμμών που περιβάλλουν το σαρκείλλημα 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 μυϊκών ινών (ASMA), περιλαμβάνονται τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA). Η παρουσία ASMA είναι γνωστό ότι προκαλεί ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα για αντισώματα κατά του ενδομυϊού. 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.

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.

Η παρουσία δύο ή περισσότερων αντισωμάτων σε έναν ορό, τα οποία αντιδρούν με τον ίδιο ιστό, ενδέχεται να επηρεάσει 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 αναστέλλουν τα IgA-EMA, καθώς τα πρώτα αντιδρούν με το σαρκόπλασμα των δερμάτων των λείων μυϊκών ινών και τα τελευταία αντιδρούν με το ενδομυϊό του σαρκείλληματος 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.

EL

Σε ορισμένους ασθενείς με κοιλιοκάκη και ανεπάρκεια IgA, απουσιάζουν τα αντισώματα κατά του ενδομυΐου 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 συνολικό 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 κιτ του συστήματος ανάλυσης αντισωμάτων κατά του ενδομυΐου (EMA) ImmuGlo™, το οποίο χρησιμοποιεί υπόστρωμα άπω οισοφάγου πρωτευνόντων και συζυγές IgA, συγκρίθηκε με ένα άλλο κιτ που διατίθεται στο εμπόριο, για την ανίχνευση αντισωμάτων EMA. 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 ήταν ως εξής:

		ImmuGlo™ EMA		
		Θετικοί (+)	Αρνητικοί (-)	Σύνολο (=)
Άλλα	Θετικοί (+)	18	0	18
EMA IFA	Αρνητικοί (-)	2	48	50
	Σύνολο (=)	20	48	68

σχετική ειδικότητα: 97%
σχετική ευαισθησία: 100%
σχετική συμφωνία: 96%



DETECCIÓN DE ANTICUERPOS Anti-Endomlsio (EMA) (CORTES DE ESÓFAGO DISTAL DE MONO)

IVD Para uso diagnóstico in vitro

PROSPECTO

REF 1114A-PDE Ensayo anticuerpos anti-endomlsio (EMA) (Cortes de esófago distal de mono) 48 análisis

REF 1114A-PDE-250 250 análisis

REF 1114G-PDE 48 análisis

USO PREVISTO

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta para las detección cualitativa y semi cuantitativa de anticuerpos anti-endomlsio (EMA) en suero humano como auxilio en el diagnóstico de enfermedad celíaca y dermatitis herpetiforme.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La detección de EMA ayuda en el diagnóstico de las enteropatías sensibles, por ejemplo enfermedad celíaca (EC) y dermatitis herpetiforme (DH). Los pacientes con EC y DH presentan anticuerpos contra endomlsio, reticulina, gliadina y transglutaminasa tisular¹⁻¹². La Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica incluyó estos marcadores serológicos entre los criterios para el diagnóstico de EC¹³. Los anticuerpos anti-endomlsio (EMA) pueden detectarse mediante inmunofluorescencia indirecta en músculo liso de mono, tal como el sustrato de esófago distal incluido en este ensayo. De los diferentes marcadores de anticuerpos para EC y DH, los EMA de la clase IgA parecen ser los más sensibles y específicos. También pueden detectarse EMA de clase IgG cuando los EMA de clase IgA se presentan en título elevado o en individuos con deficiencia de IgA. La adopción de una dieta carente de gluten determina una rápida disminución de los niveles de EMA. La ingestión de gluten o la interrupción de la dieta sin gluten provoca la aparición o el aumento de los títulos de anticuerpos anti-endomlsio. Los pacientes que siguen una dieta sin gluten durante >9 meses presentan títulos de EMA reducidos o negativos si se atienden estrictamente a las prescripciones de la dieta^{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 o IgG se detectan incubando el sustrato con conjugado de inmunoglobulina antihumano 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 endomlsial 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 seriadas¹⁴.

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

ImmuGlo™ Anticuerpos anti-endomlsio (EMA) (Cortes de esófago distal de mono) **REF** 1114A-PDE, **REF** 1114A-PDE-250, **REF** 1114G-PDE

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

8 x	SORB SLD 6	Portas de sustrato de cortes de esófago distal de mono, 6 pocillos (1114A-PDE, 1114G-PDE)
25 x	SORB SLD 10	Portas de sustrato de cortes de esófago distal de mono, 10 pocillos (1114A-PDE250)

ES










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-CONJ FITC EB	Conjugado de IgA anti humana con FITC. Contiene contraste azul de Evans. Protéjase de la luz. (3x5ml-1114A-PDE250)
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB	Conjugado de IgG anti humana con FITC. Contiene contraste azul de Evans. Protéjase de la luz. (1114G-PDE250)
1 x 60 ml	BUF	Diluyente tamponado (2x60ml-1114A-PDE250)
2 x	BUF WASH	Tampón fosfato salino (PBS). Disolver cada vial hasta 1 litro. (3x-1114A-PDE250)
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM	Medio de montaje. No congelar.
1 x 12	COVER SLD	Cubreobjetos

Para pedir la conjugación y el counterstain como componentes separados, agregue un "X" en el extremo del número de parte del kit (1114A-PDEX)

Componentes opcionales

1 x 5 ml	IgA-CONJ FITC	Conjugado de IgA antihumano con FITC. Protéjase de la luz. (3x5ml-1114A-PDE250X)
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC	Conjugado de IgG anti humana con FITC. Proteger de la luz (1114G-PDE)
1 x 1.0 ml	EVANS	Contraste azul de Evans*.

Símbolos empleados en las etiquetas:

	Número de lote
	Número de catálogo
	Utilización diagnóstica in vitro
	Utilizar antes de
	Temperatura de almacenamiento
	Consulte las instrucciones de uso
	Número de análisis
	Fabricante
	Fecha de fabricación



*Peligro. Puede provocar cáncer. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Pedir instrucciones especiales antes del uso. No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Guardar bajo llave. Eliminar el contenido/el recipiente de residuos.

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

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

ATENCIÓN: la azida de sodio (NaN₃) 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.

ES 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 diluyente tamponado 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 substrato se estabilicen a la temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraiga los portas cuidadosamente sin tocar el substrato.
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 50ul) 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 una lámina un porta de la incubadora del incubador. Sosteniéndola por un extremo, sumérjala en un recipiente con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Ponga las láminas los portas en una cubeta de coloración llena de PBS durante 10 minutos. 2-3 gotas de contrastante azul de Evans al lavado final. Repita el procedimiento en las láminas los portas restantes. NOTA: un lavado inadecuado podría producir 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 seriadas y por duplicado a partir de 1:2.5. El recíproco de la mayor dilución que provoca una reacción positiva es la titulación.

ES

Preparación de diluciones seriadas

Numere cuatro tubos de 1 a 4. Ponga 0,4 ml 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 del endomisio 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 anti-endomisio deben considerarse negativos (título inferior a 2,5), positivos (título igual o superior a 20) o, preferiblemente, positivos con título de punto final específico.

Lea la coloración específica del revestimiento endomisial de los haces de músculo liso. **Véase la foto 1.** Los anticuerpos anti-endomisio 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-endomisio. 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.

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 anti-reticulina no interfieren con la reacción de EMA porque no reaccionan con el tejido muscular liso de mono.

En ciertos pacientes con celiaquía y deficiencia de IgA están ausentes los anticuerpos anti-endomisio 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, los resultados de todos los análisis de laboratorio deben ser evaluados 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 ImmuGlo™ anticuerpos anti-endomisio (EMA) que utiliza sustrato de esófago distal de mono y conjugado IgA, se comparó con otro ensayo disponible en comercio para la detección de EMA. 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 como punto final. Los resultados fueron los siguientes:

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

especificidad relativa: 97%

sensibilidad relativa: 100%

correspondencia relativa: 96%

IVD	Für die In-vitro-Diagnostik
-----	-----------------------------

BEIPACKTEXT

REF	1114A-PDE Test für anti-endomysiale Antikörper (EMA) (Schnitte von distalem Primatenösophagus) 48 Bestimmungen
REF	1114A-PDE-250 250 Bestimmungen
REF	1114G-PDE 48 Bestimmungen

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

Der Nachweis von EMA hilft bei der Diagnose von glutenbedingter Enteropathie, d.h. Zöliakie (CD) und Dermatitis herpetiformis (DH). Bei Patienten mit CD und DH wird über Antikörper gegen Endomysium, Retikulin, Gliadin und Gewebetransglutaminase berichtet¹⁻¹². Diese serologischen Marker wurden von der European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition in die Kriterien für die Diagnose von CD aufgenommen¹³. Endomysiale Antikörper (EMA) können mittels indirekter Immunfluoreszenz auf glattem Primatenmuskel, wie dem in diesem Kit enthaltenen Substrat aus distalem Ösophagus, nachgewiesen werden. Unter den verschiedenen Antikörpermarkern für CD und DH scheinen 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 Endomysium-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}.

TESTPRINZIP

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 Klasse IgA oder 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™ Test für anti-endomysiale Antikörper (EMA) (Schnitte von distalem Primatenösophagus)

[REF] 1114A-PDE, [REF] 1114A-PDE-250, [REF] 1114G-PDE

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 48 Bestimmungen

8 x

SORB	SLD	6
------	-----	---

Objektträger mit 6 Vertiefungen mit distalem Primatenösophagus als Substrat (1114A-PDE, 1114G-PDE)

25 x

SORB	SLD	10
------	-----	----

Objektträger mit 10 Vertiefungen mit distalem Primatenösophagus als Substrat (1114A-PDE250)

DE

1 x 0,5 ml

CONTROL	+	EMA
---------	---	-----

EMA-positives Kontrollserum. Enthält Humanserum.

1 x 0,5 ml

CONTROL	-
---------	---

Negatives Kontrollserum. Enthält Humanserum.

1 x 5 ml

IgA-CONJ	FITC	EB
----------	------	----

Anti-human-IgA-FITC-Konjugat. Enthält Evans-Blau-Gegenfärbung. **Vor Licht schützen.** (3x5ml-1114A-PDE250)

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC	EB
----------	------	----

Anti-human-IgG-FITC-Konjugat mit Evans-Blau. **Vor Licht schützen** (1114G-PDE).

1 x 60 ml

BUF

Gepuffertes Verdünnungsmittel (2x60ml-1114A-PDE250)

2 x

BUF	WASH
-----	------

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). Jedes Fläschchen auf 1 Liter auffüllen (3x-1114A-PDE250)

1 x 5,0 ml

MOUNTING	MEDIUM
----------	--------

Eindeckmittel. Nicht einfrieren. (3x5ml-1114A-PDE250)

1 x 12

COVER	SLD
-------	-----

Deckgläschen (3x12-1114A-PDE250)

Um Paronym und counterstain als unterschiedliche Bestandteile zu bestellen, addieren Sie ein "X" am Ende der Installationssatzteilenummer (1114A-PDE250X)

Optionale Bestandteile

1 x 5 ml

IgA-CONJ	FITC
----------	------

Anti-human-IgA-FITC-Konjugat. Vor Licht schützen. (3x5ml-1114A-PDE250X)

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC
----------	------











Anti-human-IgG-FITC-Konjugat. Vor Licht schützen (1114G-PDE).

1 x 1,0 ml

EVANS

Evans-Blau-Gegenfärbung.

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

	Chargennummer
	Katalognummer
	In vitro diagnostischer Gebrauch
	Verwenden bis
	Lagertemperatur
	Finden Sie Anweisungen für die Verwendung
	Anzahl an Tests
	Hersteller
	Herstellungsdatum
	*Gefahr. Kann Krebs erzeugen. Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Unter Verschluss aufbewahren. Unter Verschluss aufbewahren. Inhalt/Behälter im genehmigten Abfallbeseitigung entsorgenGH-Einstufung.

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 (NaN₃) 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 dieser Kitbeilage 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.

DE PROBENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolytierte, 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 Gepuffertes Verdünnungsmittel (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 0,05 ml) 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 0,05 ml) 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. 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

DE

48 Stunden verzögert wird. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8 °C gelagert werden.

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

Röhrrchen	1	2	3	4
Serum	0,1 ml			
	+			
Gepufferter Verdüner	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 Farbintensität 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 (bei einem Titer unter 2,5), positiv (bei einem Titer von oder über 20) oder, vorzugsweise, als positiv mit spezifischem Endpunkt-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 Antikörpern gegen glatte Muskulatur (ASMA) zählen zu den anderen nachweisbaren Antikörper auch antinukleäre 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.

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

DE

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.

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), der distalen Primatenösophagus als Substrat und IgA-Konjugat anwendet, wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Kit für die Bestimmung von EMA verglichen. 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 (-)	GESAMT (=)
Pos (+)	18	0	18
Anderer NEG (-)	2	48	50
EMA IFA GESAMT (=)	20	48	68

relative Spezifität: 97%

relative Sensitivität: 100%

relative Übereinstimmung: 96%

DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-ENDOMYSIAUX (EMA) (PARTIES D'OESOPHAGE DISTAL DE SINGE)

IVD Pour une utilisation diagnostique in vitro

ENCART DU PRODUIT

REF	1114A-PDE Détection des Anticorps Anti-endomysiaux (EMA) (Parties d'Oesophage Distal de Singe) 48 Tests
REF	1114A-PDE-250 250 Tests
REF	1114G-PDE 48 Tests

Test par immunofluorescence indirecte pour la recherche et la détermination semi-quantitative des anticorps anti-endomysiaux (EMA) dans le sérum humain pour aider à diagnostiquer la maladie coeliaque et la dermatite herpétiforme.

GENERALITES

La détection des EMA est une aide pour le diagnostique de l'entéropathie sensible au gluten, c'est à dire la maladie coeliaque (CD), et de la dermatite herpétiforme (DH). Les patients souffrant de CD et de DH présentent des anticorps anti-endomysium, réticuline et gliadine et transglutaminase de tissu¹⁻¹². Ces marqueurs sérologiques ont été récemment incorporés dans les nouveaux critères de diagnostique de la CD par la European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition¹³. Les anticorps endomysiaux (EMA) peuvent être détectés par immunofluorescence indirecte sur muscle lisse de singe tel que le substrat oesophage distal compris dans ce kit. Parmi les différents anticorps témoins de la CD et de la DH, les EMA de la classe des IgA semblent être les marqueurs les plus sensibles et les plus spécifiques. Les EMA de la classe des IgG se retrouvent également lorsque les EMA de la classe des IgA ont un titre élevé ou chez les individus qui manquent de IgA. Une diminution rapide du niveau des EMA s'observe dès que le patient adopte un régime sans gluten. Une compétition du gluten ou un manque de persévérance dans le régime sans gluten fait réapparaître et augmenter les titres des anticorps anti-endomysiaux. Les patients suivant avec persévérance un régime sans gluten depuis plus de 9 mois présentent une réduction voire une disparition des EMA^{1, 6-8,10}.

PRINCIPES DE LA METHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce kit, le sérum du patient est incubé sur des substrats, ce qui permet la fixation des anticorps avec le substrat. Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué anti-IgA humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps de classe IgA fixés. Les réactions sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert pomme de la ligne endomysiale du faisceau des muscles lisses montre la présence d'anticorps EMA. Le titre du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé par dilutions sériques successives¹⁴.

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs entre 2°et 8°C. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Avant utilisation, attendre que les réactifs atteignent l'équilibre à la température ambiante du laboratoire.

Matériel fourni

ImmuGlo™ Détection des Anticorps Anti-endomysiaux (EMA) (Parties d'Oesophage Distal de Singe)

REF 1114A-PDE, **REF** 1114A-PDE-250, **REF** 1114G-PDE

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 48 tests chacun.

8 x	SORB SLD 6	6 Lames avec substrat d'oesophage distal de singe. (1114A-PDE, 1114G-PDE)
25 x	SORB SLD 10	10 Lames avec substrat d'oesophage distal de singe. (1114A-PDE250)
1 x 0,5 ml	CONTROL + EMA	Contrôle positif EMA. Contient sérum humain.

FR

1 x 0,5 ml	CONTROL -	Contrôle négatif. Contient sérum humain.
1 x 5 ml	IgA-CONJ FITC EB	Conjugué FITC anti-IgA humaines. Contient coloration d'Evans. Maintenir à l'abri de la lumière. (3x5ml-1114A-PDE250)
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB	Conjugué FITC anti-IgG humaines avec Bleu d'Evans. Maintenir à l'abri de la lumière (1114G-PDE).
1 x 60 ml	BUF	Diluant tamponné (2x60ml-1114A-PDE250)
2 x	BUF WASH	Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre. (3x-1114A-PDE250)
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM	Milieu de montage. Ne pas congeler. (3x5ml-1114A-PDE250)
1 x 12	COVER SLD	Lamelles couvre-lames (3x12-1114A-PDE250)
Pour commander le conjugué et le counterstain en tant que composants séparés, ajoutez un ";X" ; à l'extrémité du numéro de la pièce de kit (1114A-PDE250X)		
1 x 5 ml	IgA-CONJ FITC	Conjugué FITC anti-IgA humaines. Maintenir à l'abri de la lumière. (3x5ml-1114A-PDE250X)
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC	Conjugué FITC anti-IgG humaines. Conserver à l'abri de la lumière (1114G-PDE).
1 x 1,0 ml	EVANS	Contre-colorant Bleu d'Evans*.

Symboles utilisés sur les étiquettes:

Numéro de Lot



Numéro catalogue



Utilisation à diagnostic in vitro



A utiliser avant



Température de stockage



Consulter les instructions d'emploi



Nombre de tests



Fabricant



Date de fabrication



*Danger. Peut provoquer le cancer. Se procurer les instructions avant utilisation. Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/ aerosols. EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. Garder sous clef. Éliminer le contenu/récipient dans l'élimination des déchets approuvée

Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Bac à coloration pour le lavage des lames (bac Coplin)
- Petits tubes (ex : 13 X 75 mm) et porte-tubes
- Eau distillée ou déionisée
- Eprouvette graduée 1l
- Flacon pour solution de lavage
- Serviettes en papier
- Chambre d'incubation

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage¹⁵.

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN_3). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit composants par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la

FR
date de péremption.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

MODE OPERATOIRE

A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:2.5 à l'aide du diluant tamponné fourni (0.2ml de sérum + 0.3ml de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des anticorps dans le cas où le dépistage serait positif.
2. Laisser les lames prendre la température du laboratoire pendant 10-15 minutes dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat.
3. Numéroter les lames et les placer dans la chambre humidifiée avec des serviettes en papier mouillées pour éviter le dessèchement.
4. Retourner le flacon doseur et appuyer doucement pour déposer 1 goutte (environ 50µL) de Contrôle Négatif sur le puit n°1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif sur le puit n°2. Eviter de déborder des puits.
5. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µL) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder des puits.
6. Replacer le couvercle sur la chambre et incubé les lames 30 minutes à température ambiante.
7. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette contenant environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un becher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
8. Retirer une (les) lame(s) du bac de coloration. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. Déposer la lame dans la chambre d'incubation. Retourner les flacons doseurs de conjugué et déposer immédiatement 1 goutte (environ 50µL) dans chaque puit.
9. Répéter les étapes 7 à 8 avec chaque lame.
10. Replacer le couvercle sur la chambre d'incubation et incubé 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 du bac. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. **Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est encore humide.**
13. Déposer doucement 3 gouttes de milieu de montage dans chaque puits et appliquer la lamelle couvre-lame. Ne pas appliquer de pression excessive et éviter les mouvements latéraux de la lamelle.
14. Répéter les étapes 12 et 13 avec chaque lame.
15. Observer la fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope au grossissement X200 ou plus.

Les lames peuvent être lues immédiatement. Cependant, grâce à la présence d'un agent anti-fading dans le milieu de montage, la lecture peut être retardée jusqu'à 48 heures sans perte significative de l'intensité de fluorescence. Dans ce cas les lames doivent être conservées à l'obscurité entre 2 et 8°C.

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les étapes 5 à 13 afin de définir son titre. Inclure dans chaque nouvelle série un contrôle positif et négatif. Les dilutions en série de 2 en 2 sont réalisées à

FR

partir du 1 : 2.5. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

Préparation des dilutions en série

Numéroter quatre tubes de 1 à 4. Ajouter 0.4 ml diluant tamponné dans le tube 1 et 0.2 ml dans les tubes 2 à 4. Pipeter 0.2ml de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0.2 ml du tube 1 dans le tube suivant. Continuer à transférer 0.2 ml d'un tube à l'autre en mélangeant bien chaque tube pour arriver aux dilutions suivantes :

Tubes	1	2	3	4
Sérum	0,1 ml			
	+			
Diluant Echantillon	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↗	↗	↗
Transfert		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilution finale	1:5	1:10	1:20	1:40 etc.

CONTROLE DE QUALITE

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne doit pas donner d'image fluorescente de la ligne endomyosiale du faisceau des muscles lisses tandis que le contrôle positif doit donner une fluorescence des tubules de ces structures.

Dans le cas où les contrôles ne donneraient pas les résultats attendus, il est recommandé de refaire le test. Si le problème persiste, cela peut être lié à :

- La turbidité. Eliminer le contrôle et en utiliser un nouveau.
- Au système optique du microscope. Par exemple: mauvais alignement, lampe ayant dépassé sa durée de vie, etc.
- A un assèchement des lames pendant la manipulation.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats des essais pour la recherche des anticorps EMA doivent être considérés négatifs (avec titre inférieur à 2.5) ou bien positifs (avec titre plus grand ou égal à 20), ou encore positifs avec un titre de point de virage spécifique.

Ne considérer que les champs comprenant une coloration spécifique de la ligne endomyosiale du faisceau des muscles lisses. **Voir photo 1.** Les anticorps endomyosiaux réagissent comme un réseau de fines lignes irrégulières autour du sarcolème de chaque fibrille de muscle lisse. Il y a donc une différence de forme avec les anticorps anti-muscle lisse qui réagissent avec le sarcoplasme. **Voir photo 2.**

Il y a d'autres anticorps détectables en plus des anticorps anti-muscle lisse (ASMA) tels que les anticorps anti-nucléaires (ANA). La présence des ASMA est une cause de faux négatif des anticorps endomyosiaux. Si des ASMA sont découverts, l'échantillon doit être testé à des dilutions plus grandes ¹. Les réactions ANA sur les muscles lisses, lorsqu'elles se produisent, sont généralement faibles et éparpillées et, donc, ne causent pas de faux négatifs.

LIMITES D'UTILISATION

Parfois un sérum EMA positif peut donner un résultat faiblement positif ou négatif à la dilution de dépistage (effet de zone). Dans ces cas douteux, les sérums devront être testés à des dilutions supérieures et, si le résultat est positif, déterminer le titre des anticorps.

Parfois la présence de deux ou plus anticorps différents dans le sérum ayant une réactivité vis-à-vis du même substrat peut créer des interférences pour la détection en immunofluorescence. Cela peut masquer la détection des EMA ou cacher le titre si l'anticorps qui interfère a un titre plus élevé que celui des EMA. La cause la plus fréquente d'interférence dans les tests EMA est la coexistence d'anticorps des muscles lisses. Il est recommandé que les sérums des patients qui contiennent également des ASMA soient retestés à des dilutions plus grandes. Les ASMA de la classe IgA ne sont pas courants. Les ASMA de la classe des IgG ne bloquent pas les EMA IgA car ces premiers réagissent avec le sarcoplasme des muscles lisses et que ces derniers réagissent avec l'endomysium de la sarcolème se trouvant autour des faisceaux des muscles lisses. Les anticorps anti-réticuline n'interfèrent pas dans les réactions des EMA car ils ne réagissent pas avec les tissus des muscles lisses de singe.

Chez certains patients souffrant de CD et manquant de IgA, les anticorps endomyosiaux de la classe des IgA sont absents. Ce qui entraîne que ce type de patients soit généralement positif pour les EMA de la classe des IgG.

FR

Les patients souffrant de CD et suivant un régime sans gluten depuis plus de 9 mois seront négatifs au test de recherche des EMA.

Lors du diagnostic, les résultats du laboratoire doivent être évalués avec l'histoire clinique du patient.

VALEURS PREVUES

Comme indiqué dans le tableau 1, les EMA détectés sur les muscles lisses de singe sont des marqueurs très spécifiques de la maladie coeliaque et de la dermatite herpétiforme. La présence des EMA semble plus liée à une pathologie intestinale dans les deux cas de maladie qu'à des lésions de la peau dans la dernière comme décrit dans la figure 1.

PERFORMANCES

Le kit de test des anticorps anti-endomysiaux (EMA) Immco™, utilisant du substrat d'oesophage distal de singe et un conjugué IgA, a été comparé avec un autre kit de détection des EMA du commerce. La comparaison comprend un total de 68 sérums : 20 provenant de patients suspectés de maladie coeliaque et 48 de contrôles normaux. Les sérums ont été testés selon les procédures recommandées par le fabricant. Un test de dilution 2.5 a été réalisé et tous les sérums positifs aux EMA ont été titrés. Les résultats sont les suivants:

		Immco™ EMA		
		Positif (+)	Négatif (-)	Total (=)
	Positif (+)	18	0	18
Autres	Négatif (-)	2	48	50
EMA IFA	TOT (=)	20	48	68

Spécificité relative: 97%

Sensibilité relative: 100%

Concordance : 96%



Test anticorpi anti-(EMA)-(Sezioni di esofago distale di scimmia) endomisio

IVD Per uso diagnostico in vitro

Inserito del prodotto

REF	1114A-PDE	48 determinations
REF	1114G-PDE	48 Determinations
REF	1114A-PDE-250	250 Determinations

Finalita' d'uso

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

Sommario e spiegazione del test

La rilevazione 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 marker sierologici sono stati incorporati tra i criteri per la diagnosi della malattia celiaca dalla Società Europea di Gastroenterologia e Nutrizione Pediatrica¹³. Gli anticorpi anti-endomisio (EMA) possono essere rilevati per immunofluorescenza indiretta su muscolo liscio di scimmia e quindi sul substrato da esofago distale incluso in questo kit. Kei marcatori anticorpali della MC e della DH, gli EMA di classe IgA sembrano essere il marcatore maggiormente sensibile e specifico. Gli EMA di classe IgG sono presenti anche quando si hanno EMA di classe IgA in titoli elevate o in individui con deficit di IgA. L'aderenza ad una dieta priva di glutine porta a una rapida regressione dei livelli degli EMA, mentre un challenge del glutine o l'assunzione di alimenti con glutine portano alla comparsa o all'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 aderiscono rigorosamente alle limitazioni nutrizionali previste^{1,6-8, 10}.

Principi Delle Metodiche

Il metodo per 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 sono rilevati per incubazione del substrato con coniugato anti-immunoglobuline umane 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

Test Anticorpi Anti-endomisio (EMA) (Sezioni di Esofago Distal di Scimmia)

8 x	SORB SLD 6	Vetrini da 6, Substrato Esofago Distale di Scimmia REF 1114A-PDE, 1114G, PDE
25 x	SORB SLD 10	Vetrini da 10, Substrato Esofago Distale di Scimmia REF 1114A-PDE-250

IT				
1 x 0,5 ml	CONTROL	-		Controllo Negativo. Contiene siero umano.
1 x 5 ml	IgA-CONJ	FITC	EB	Coniugato FITC anti-IgA umane. Colorante di contrasto Blu di Evans. Proteggere dalla luce. (3x5ml-1114A-PDE250)
1 x 5 ml	IgG-CONJ	FITC	EB	Conjugato FITC anti-IgG umane. Colorante di contrasto Blu di Evans. Proteggere dalla luce (1114G-PDE).
1 x 60 ml 2 x	BUF			Diluyente a tampone (2x60ml-1114A-PDE250)
	BUF	WASH		Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). Da ricostituire a 1 litro. (3x-1114A-PDE250)
1 x 5,0 ml	MOUNTING	MEDIUM		Liquido di montaggio. Non congelare. (3x5ml-1114A-PDE250)
1 x 12	COVER	SLD		Vetrini coprioggetto (3x12-1114A-PDE250)

Per ordinare il coniugato e il counterstain come componenti separate, aggiunga un "X" all'estremità del numero del pezzo del corredo (1114A-PDE250X)

Componenti opzionali

1 x 5 ml

IgA-CONJ	FITC
----------	------

Coniugato FITC anti-IgA umane. Proteggere dalla luce. (3x5ml-1114A-PDE250X)

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC
----------	------

Coniugato FITC anti-IgG umane. (il primate ha assorbito) (1114G-PDE)

1 x 1,0 ml










EVANS

Colorante di contrasto Blu di Evans*.

REF

 2510

Simboli utilizzati sulle etichette

	Codice del lotto
	Numero di catalogo
	Per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Utilizzare entro
	Temperatura di conservazione
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Numero di test
	Fabbricante
	Data di fabbricazione



*Pericolo. Può provocare il cancro. Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. Conservare sotto chiave. Smaltire il prodotto/recipiente nello smaltimento dei rifiuti approvato.

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.

ATTENZIONE- L'azide sodica (NaN₃) 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 a tampone 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 50µL) di Controllo Negativo nel pozzetto #1. Allo stesso modo applicare 1 goccia di Controllo Positivo nel pozzetto #2. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti. Controllo Positivo nel pozzetto #2. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Usando una micropipette o pipette Pasteur, applicare 1 goccia di siero diluito del paziente (circa 50µL) 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 0,05 ml) 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 rimuove 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 in 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 del valore 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 diluente tampone 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 Tamponato	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↗	↗	↗
Trasferimento		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluizione finale	1:5	1:10	1:20	1:40 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 titolo endpoint specifico.

Leggere 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 attorno 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 falsamente negativi.

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 antimuscolo liscio. Si raccomanda di testare ulteriormente, a diluizioni maggiori, i sieri dei pazienti che contengono ASMA. L'occorrenza degli ASMA di della 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'endomiso del sarcolemma che riveste 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.

In alcuni pazienti con malattia celiaca e deficit di IgA, gli anticorpi anti-endomisio di classe IgA sono assenti. Tuttavia, tali pazienti risultano generalmente positivi per gli EMA di 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 completa storia clinica del paziente.

VALORI ATTESI

Come si può vedere nella Tabella 1, gli EMA rilevati su muscolo liscio di scimmia sono marcatori altamente specifici per la celiachia e 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.

PERFORMANCE DEL TEST

Il Test di Rilevazione di Autoanticorpi Anti-endomisio (EMA) ImmuGlo™, che usa come substrato sezioni di esofago distale di scimmia e coniugato IgA, è stato confrontato con un test analogo in fluorescenza per la rilevazione degli EMA disponibile in commercio. 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:

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

Specificità: 97%

Sensibilità: 100%

Concordanza: 96%



IVD	Para diagnóstico in vitro
-----	---------------------------

FOLHETO DO PRODUTO

REF	1114A-PDE	48 Determinações
REF	1114A-PDE-250	250 Determinações
REF	1114G-PDE	48 Determinações

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 do diagnóstico de doença celíaca e de dermatite herpetiforme.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A detecção de EMA auxilia o diagnóstico de enteropatia sensível ao glúten, ou seja, doença celíaca (DC) e dermatite herpetiforme (DH). Os doentes com DC e DH apresentam anticorpos contra o endomísio, reticulina, gliadina e transglutaminase tissular¹⁻¹². Estes marcadores serológicos foram incorporados nos critérios para o diagnóstico de DC pela Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica¹³. Os anticorpos anti-endomisiais (EMA) podem ser detectados por imunofluorescência indirecta em músculo liso de primatas como, por exemplo, o substrato de esófago distal incluído neste kit. Dos variados marcadores de anticorpos para DC e DH, os EMA da classe IgA parecem ser os mais sensíveis e específicos. Os EMA da classe IgG também podem ocorrer nas situações em que os EMA da classe IgA estão presentes em título mais elevado ou em indivíduos que têm deficiência de IgA. Uma rápida dos níveis de EMA ocorre quando os doentes seguem uma dieta sem glúten. Uma introdução de glúten ou a interrupção de uma dieta sem glúten levam ao aparecimento ou ao aumento dos títulos de anticorpos anti-endomisiais. Os doentes que seguem uma dieta sem glúten durante > 9 meses apresentam títulos de EMA baixos ou negativos desde que cumpram as 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 ligam, da classe IgA ou 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 adequados. A presença de EMA é demonstrada por uma fluorescência verde-maçã do revestimento endomisial dos feixes de músculo liso. O título (o recíproco da maior diluição que provocou uma reacção positiva) do anticorpo é então determinado testando diluições em série¹⁴.

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

Teste de anticorpos anti-endomisiais (EMA) ImmuGlo™ (cortes de esófago distal de primata) **REF** 1114A-PDE, **REF** 1114A-PDE-250, **REF** 1114G-PDE

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 48 determinações.

8 x	SORB SLD 6	Lâminas de substrato de esófago distal de primata com 6 poços (1114A-PDE, 1114G-PDE)
25 x	SORB SLD 10	Lâminas de substrato de esófago distal de primata com 10 poços (1114A-PDE250)
1 x 0,5 ml	CONTROL + EMA	Controlo positivo para EMA. Contém soro humano

PT

1 x 0,5 ml

CONTROL -

Controlo negativo. Contém soro humano.

1 x 5 ml

IgA-CONJ FITC EB

Conjugado de IgA anti-humana com FITC. Contém contrastante azul de Evans. Proteger da luz. (3x5ml-1114A-PDE250)

1 x 5 ml

IgG-CONJ FITC EB

Conjugado de IgG anti-humana com FITC contendo azul de Evans. Proteger da luz (1114G-PDE)

1 x 60 ml

BUF

Diluyente tamponado (2x60ml-1114A-PDE250)

2 x

BUF WASH

Tampão fosfato salino (PBS). Dissolver cada frasco em 1 l. (3x-1114A-PDE250)

1 x 5,0 ml

MOUNTING MEDIUM

Meio de montagem. Não congelar. (3x5ml-1114A-PDE250)




1 x 12

COVER SLD










Lamelas (3x12-1114A-PDE250)

PT

Para requisitar o conjugado e o counters tain como componentes separados, adicione um "X" na extremidade da número da peça do jogo (1114A-PDE250X)

1 x 5 ml		Conjugado de IgA anti-humana com FITC. Proteger da luz. (3x5ml – 1114A-PDE250X)
1 x 5 ml		Conjugado de IgG anti-humana com FITC. Proteger da luz. (3x5ml – 1114G-PDE).
1 x 1,0 ml		Contrastante azul de Evans*

Símbolos utilizados nos rótulos:

	Número de lote
	Número de catálogo
	Utilização diagnóstica <i>in vitro</i>
	Utilização por
	Temperatura de armazenamento
	Consulte as instruções de utilização
	Número de testes
	Fabricante
	Data de fabricação



*Perigo. Pode provocar cancro. Pedir instruções específicas antes da utilização. Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico. Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. Armazenar em local fechado à chave. Armazenar em local fechado à chave. Eliminar o conteúdo/recipiente em eliminação de resíduos aprovada.

Materiais necessários mas não fornecidos

- Microscópio de fluorescência
- Micropipeta ou pipeta de Pasteur
- Pipetas serológicas
- Recipiente de coloração (ex: frasco de Joplin)
- Tubos de ensaio pequenos 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,

PT

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 deite 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 componentes dos kits com outros de outras origens diferentes do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Não utilize 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. Conserve 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. Despiste

1. Dilua cada soro do doente a 1:2.5 com o diluente tamponado 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 delicadamente para aplicar 1 gota (cerca de 50uL) de Controlo Negativo no poço n.º 1. Do mesmo modo, deite 1 gota de Controlo Positivo no 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 50uL) nos outros poços. Evite encher demais os poços.
6. Coloque a tampa na câmara de incubação e incube as lâminas 30 minutos à 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 por 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 de Conjugado e aperte ligeiramente para deitar 1 gota (aproximadamente 0,05 ml) 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 o bordo 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 a titulação. Cada teste deve incluir os Controlos Positivo e Negativo. Efectue diluições duplicadas em série partindo de 1:2,5. O recíproco da diluição maior que provocou uma reacção positiva é a titulação.

Preparação de diluições em série

Numere seis tubos de 1 a 4. Deite 0,4 ml diluente tamponado 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
		↗	↗	↗
Transfira		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 apresentar fluorescência específica do revestimento do endomísio dos feixes de músculo liso, enquanto o Controlo Positivo deve ter uma intensidade de coloração 2+ ou superior dos túbulos destas 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 (com título inferior a 2,5), positivos, (com título igual ou superior a 20) ou preferivelmente positivos com título de ponto final específico.

Leia a coloração específica do revestimento do endomísio dos feixes de músculo liso. **Ver a Fotografia 1.** Os anticorpos anti-endomisiais reagem como uma rede de linhas finas e irregulares em redor do sarcolema das fibras do músculo liso do indivíduo. Isto é em contraposição absoluta com os anticorpos anti-músculo liso os quais reagem com o sarcoplasma. **Veja a Fotografia 2.**

Outros anticorpos detectáveis, para além dos anticorpos anti-músculo liso (ASMA), incluem anticorpos anti-nucleares (ANA). Sabe-se que a presença de ASMA provoca resultados falsos negativos de anticorpos anti-endomisiais. Se forem detectados ASMA, então as amostras devem ser testadas com diluições maiores¹. As reacções ANA no tecido do músculo liso, quando se apresentam, são normalmente fracas e mal distribuídas e, portanto, é improvável que provoquem resultados falsos negativos.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Nalguns casos, o soro positivo a EMA poderá também ser muito fraco ou negativo na diluição de despiste inicial (fenómeno pró-zona). 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 é reactivo com o mesmo tecido poderá provocar uma interferência na sua detecção por imunofluorescência. Esta interferência também pode provocar a falta de detecção de EMA ou uma supressão do seu título se o anticorpo de interferência tiver uma titulação superior ao EMA. A causa mais comum do fenómeno de interferência nos testes EMA é a coexistência de anticorpos anti-músculo liso. Aconselha-se que os soros dos doentes que também contêm ASMA sejam novamente testados com diluições superiores. Os ASMA da classe IgA não são comuns. Os ASMA da classe IgG não bloqueiam os anticorpos EMA da classe IgA porque o primeiro reage com o sarcoplasma dos feixes dos músculos lisos e o último reage com o endomísio do sarcolema em redor dos feixes dos músculos lisos. Os anticorpos anti-reticulina não interferem com a reacção de EMA porque não reagem com o tecido muscular liso dos primatas.

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

Os doentes com doença celíaca em dieta isenta de glúten por > 9 meses são invariavelmente negativos a EMA.

Quando se elabora um diagnóstico, os resultados de todos os testes de laboratório devem ser sempre avaliados em conjunto com a história clínica completa do doente.

VALORES PREVISTOS

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMENTO

O kit de teste de anticorpos anti-endomisiais (EMA) ImmuGlo™, usando esófago distal de primata como substrato e conjugado de IgA, foi comparado com outro kit adquirido no comércio para detecção de EMA. 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 recomendado pelo fabricante. Foi usada uma diluição de despistagem de 2,5 e todos os soros positivos a EMA foram titulados como ponto de tara. Os resultados são 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%

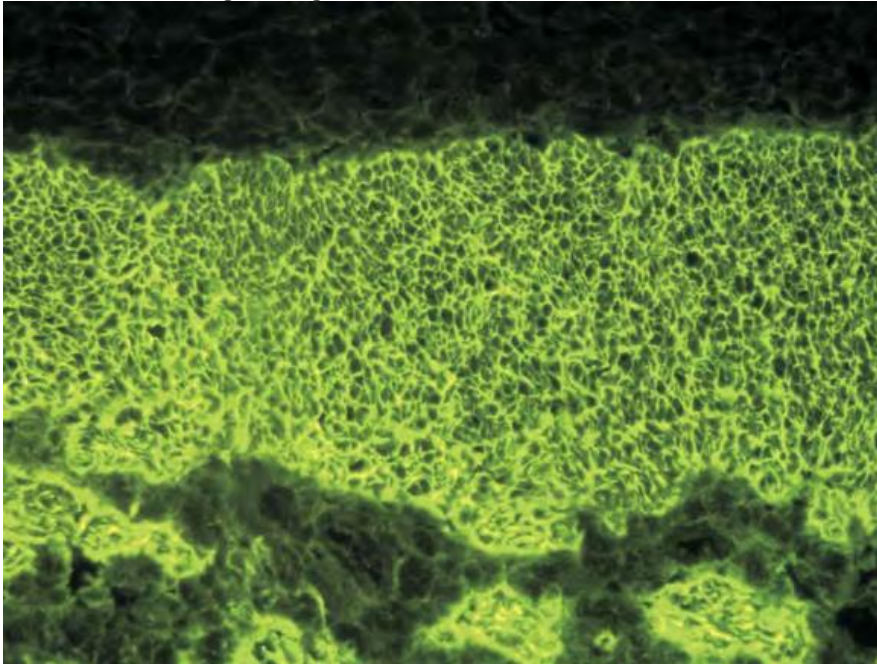
sensibilidade relativa: 100%

concordância relativa: 96%

REFERENCES

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, 30:1225-1232.
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. ,Q³,PPXQRSDWKRORJ\ RI WKH 6NLQ', %HXWQHU (+, &KRUJHOVNL 7S DQG .XPDU 9, (GV, -RKQ :LOH\ DQG 6RQV 1HZ 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 distal esophagus, 200X.
Note staining of lining of the smooth muscle bundles.**



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

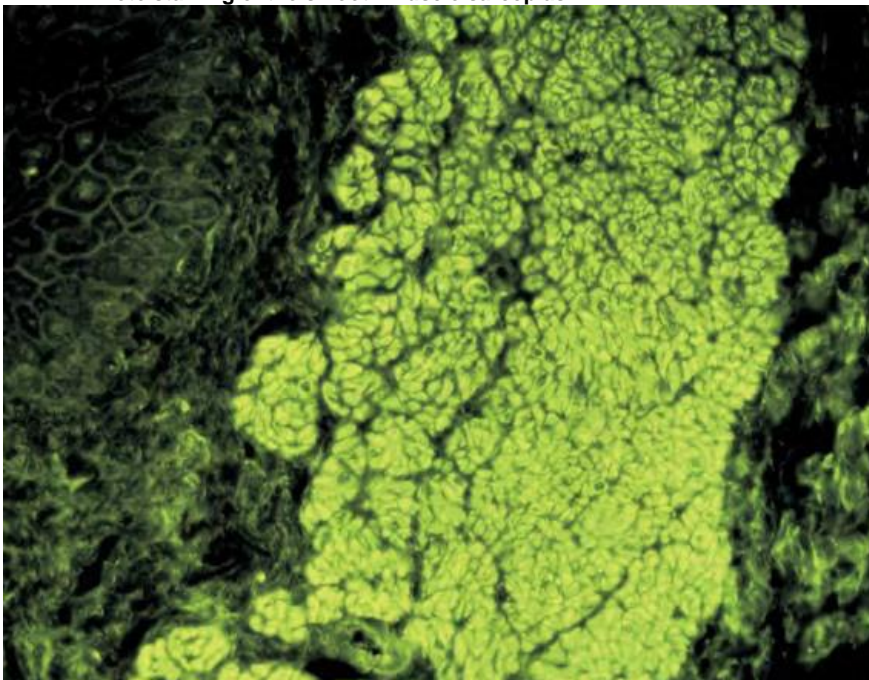


Figure 1: Correlation of IgA-EMA titers in Villous Atrophy

5120		.
2560		.
1280		...
640	
320
160
80
40
20
10	..	.
5
2.5	.	
< 2.5	
	Normal	Partial
		Subtotal

Villous Atrophy

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		
Dermatosis	4	0
Other Skin Diseases	180	0

Compiled from the literature as per Chorzelski TP et al¹.

For technical assistance please contact:



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



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands