



IMMCO
DIAGNOSTICS

ImmuGlo™ Anti-Endomysial Antibody (EMA) Test System

For *in vitro* diagnostic use

IVD

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

PRODUCT INSERT

Code 1114

48 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

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

PRINCIPLES OF PROCEDURES

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

PRODUCT INFORMATION

Storage and Preparation

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

Materials Provided

ImmuGlo™ EMA IFA REF 1114

Kits contain sufficient reagents to perform 48 determinations each.

8 x	SORB SLD	6 well Primate Smooth Muscle Substrate Slides
1 x 0.5 ml	CONTROL + EMA *	EMA Positive Control. Contains human serum.
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC *	Anti-human polyvalent FITC Conjugate. Protect from light.
1 x 60 ml	BUF *	Sample Diluent.
2 vials	BUF WASH	Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Mounting Medium. Do not freeze.
1 x 1.0 ml	EVANS	Evan's Blue Counterstain.
1 x 12	COVER SLD	Coverslips

* Contains < 0.1% NaN₃

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 materials¹⁴.

WARNING - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. 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. Do not use beyond expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

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

PROCEDURE

Test Method

A. Screening

1. Dilute each patient serum 1:2.5 with the Sample Diluent provided (0.2 ml serum + 0.3 ml Diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for 10-15 minutes. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of Positive Control to well #2. Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash 10 minutes. Repeat process with all remaining slides.
8. Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the Conjugate dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) to each well.
9. Repeat steps **7 and 8** for each slide.
10. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate 30 minutes at room temperature.
11. Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for 10 minutes. If desired, 2-3 drops of Evans blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **3 drops** of Mounting Medium evenly on the coverslip and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.
14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.




Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed for up to 48 hours. Slides should be stored in the dark at 2-8°C.

B. Endpoint Determination (titration)

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

Preparation of Serial Dilutions

Number four tubes 1 through 4. Add 0.3 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.

RESULTS

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

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

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

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

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The ImmuGlo™ EMA IFA Test System: CLIA Complexity: High; CDC Analyte Identification Code: 0497; CDC Test System Identification Code: 2828.

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

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

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

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

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

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

EXPECTED VALUES

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

		IMMCO EMA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other/Autre/Otro	POS (+)	18	0	18
Andere/Altro/Otra	NEG (-)	2	48	50
EMA IFA	TOT (=)	20	48	68

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificITÀ relativa/especificidade relativa:	97%
relative sensitivity/sensibilit� relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivität/sensibilit� relativa/sensibilidade relativa:	100%
relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative �bereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo:	96%



ImmuGlo™ Anti-Endomysium Anticorps (EMA) Test

IVD

IMMCO
DIAGNOSTICS

REF 1114

EMA

48 Déterminations

Test par immunofluorescence indirecte pour la recherche et la détermination semi-quantitative des anticorps anti-endomysium (EMA) dans le sérum humain pour le diagnostic de la maladie coeliaque (CD) et la Dermatite Herpétiforme (DH).

GENERALITES

Les anticorps d'Endomysium (EMA), comme rapporté dans la littérature, sont détectés principalement sur le muscle lisse de l'oesophage de singe par l'immunofluorescence indirecte. La détection d'EMA aide dans le diagnostic de la maladie coeliaque (CD) et *dermatitis herpetiformis* (DH). On rapporte que des patients avec le CD et le DH ont des anticorps à l'endomysium, au reticuline et à la gliadine¹⁻¹². Ces marqueurs sérologiques ont été récemment incorporés aux critères révisés pour le diagnostic du CD par la société européenne de la gastroentérologie et de la nutrition pédiatriques¹³. Des divers marqueurs d'anticorps du CD, EMA IgA semblent être le marqueur le plus sensible et le plus spécifique. EMA IgG se produisent également quand EMA IgA sont dans le titre élevé ou dans les individus qui sont IgA déficient. Une diminution rapide des niveaux d'EMA résulte avec l'adhérence à un régime libre de gluten. Un défi de gluten ou un manque de maintenir un régime libre de gluten mène à l'aspect ou à une augmentation des titres d'EMA. Les patients à un régime libre de gluten > 9 mois ont réduit ou des titres négatifs d'EMA s'ils adhèrent à leurs restrictions de régime^{1,6-8,10}.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce coffret, le sérum du patient est incubé sur des sections de tissu, ce qui permet la fixation des autoanticorps avec le substrat. Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué humaine, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps fixés de classe IgG et IgA. Les réactivités sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert-pomme du double endomysium du muscle lisse empaquette montre la présence d'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

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

Matériel fourni

ImmuGlo™ EMA IFA REF 1114

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 48 déterminations chacune.

8x **SORB** **SLD** **6**

1 x 0,5 ml **CONTROL** **+** **EMA** *

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

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

1 x 60 ml **BUF** *

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

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

1 x 1,0 ml **EVANS**

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

Lames 6 puits de EMA

Contrôle positif EMA, sérum humain

Contrôle négatif, sérum humain

Conjugué FITC anti-IgA/IgG humaines. Maintenir à l'abri de la lumière

Diluant sérum, avec de la BSA

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

Milieu de montage. Ne pas congeler

Contre colorant Bleu d'Evans

Lamelles couvre-lames

* Contient < 0.1% NaN₃

Matériel nécessaire mais non fourni

Microscope à fluorescence
 Micropipette ou pipette Pasteur
 Pipette sérologique
 Bac à coloration pour le lavage des lames
 Petits tubes (ex 13X75 mm) et portoir
 Eau distillée ou déionisée
 Epruvette graduée 1l
 Flacon pour solution de lavage
 Serviettes en papier
 Chambre d'incubation

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

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 trouvé non réactif en antigène 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'usage¹⁴.

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium. Ce composé peut former avec des canalisations de plomb ou de cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, lors de l'élimination de ces réactifs dans un évier, rincer l'évier à grande eau.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du coffret composants par d'autres provenant d'autres fabricants.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Seuls les sérums peuvent être utilisés dans ce test. Il est recommandé de ne pas les

utiliser les sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne pouvant provoquer des interférences avec les performances du test. Conserver les sérums à 2-8°C pendant une semaine au maximum. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

MODE OPÉRATOIRE

A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:2.5 dans le diluant échantillon fourni (0.2ml de sérum + 0.3 ml de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des autoanticorps dans le cas où le dépistage sera trouvé positif.
2. Laisser revenir les lames à 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 en chambre humide avec des serviettes papier mouillées pour éviter l'assèchement.
4. Appuyer doucement sur le flacon pour déposer 1 goutte (environ 50µl) de Contrôle Négatif sur le puits #1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif sur le puits #2. Eviter de déborder des puits.
5. Avec une micropipette ou une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder les puits.
6. Recouvrir la chambre humide et incubé les lames 30 minutes à température ambiante.
7. Sortir une lame de la chambre humide. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette et environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un bécher 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 lame du bac. Eliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Déposer la lame dans la chambre humide. Déposer immédiatement 1 goutte de conjugué dans chaque puits.
9. Répéter les étapes 7 et 8 avec chaque lame.
10. Recouvrir la chambre humide et incubé 30 minutes à température ambiante.
11. Sortir une lame de la chambre humide. Plonger la lame dans un bécher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Si une contre-coloration est souhaitée, ajouter 2-3 gouttes de Bleu d'Evans dans le dernier bain de lavage. Répéter les opérations avec toutes les lames.
REM: Un lavage incorrect peut causer la fluorescence de fond élevé.
12. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est humide.
13. Déposer doucement 3 gouttes de milieu de montage dans la lamelle couvre-lame également 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 à 2-8°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 partir du 1:2,5. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

Préparation des dilutions en série.

Numeroter quatre tubes de 1 à 4. Ajouter 0,3ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0,2 ml dans les tubes 2 à 4. Pipetter 0,2ml de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0,2 ml du tube 1 dans le tube suivant et après agitation répéter la même opération pour les tubes suivants comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

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

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne donne pas d'image fluorescente sur les doublure endomysium du muscle lisse empaquette, tandis qu'avec le contrôle positif on obtient, sur lames fixées à l'éthanol, une fluorescence 2+ ou supérieure des tubes de ces structures.

Dans le cas où les contrôles ne donnent 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.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des tests EMA sont rendus négatifs (<2.5), ou positifs avec le titre. Préciser s'il s'agit d'une fluorescence spécifique, les doublure endomysium du muscle lisse empaquette.

Voir Photo 1. Les EMA réagissent comme réseau des lignes minces et irrégulières autour du sarcolemme des différentes fibrilles lisses de muscle. C'est en anticorps anti-lisses pointus d'un muscle de contraste qui réagissent avec le sarcoplasm. **Voir Photo 2.**

D'autres anticorps discernables sans compter qu'ASMA incluent ANA. La présence d'ASMA est connue pour causer des résultats négatifs faux pour les EMA. Si ASMA sont détectés, alors l'échantillon devrait être examiné à des dilutions plus élevées. Les réactions d'ANA sur le tissu lisse de muscle, quand elles se produisent, sont habituellement faibles et peu abondamment distribuées et, en conséquence, peu susceptible de causer des résultats négatifs faux.

Consultez Photo 1 et Photo 2 à la fin des réactions de ce document par exemple.

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 ce cas, préparer les dilutions en série de l'échantillon et déterminer le titre de l'anticorps.

Parfois la présence de deux ou plus autoanticorps différents dans le sérum peut créer des interférences en immunofluorescence.

Cela peut masquer la détection de l'EMA ou cacher le titre si l'anticorps qui interfère a un titre plus élevé que celui des EMA. Le cas le plus fréquemment rencontré dans le test des EMA est une interférence avec les ASMA.

On lui recommande que des sérums de patients qui contiennent également ASMA soient examinés plus loin à des dilutions plus élevées. La classe ASMA d'IgA ne sont pas une occurrence commune. La classe ASMA d'IgG ne bloquent pas IgA-EMA en tant qu'ancien réagissant avec le sarcoplasm des paquets lisses de muscle et les derniers réagissent avec l'endomysium du sarcolemme autour des paquets lisses de muscle. Les anticorps anti-reticuline n'interfèrent pas la réaction d'EMA parce qu'ils ne réagissent pas avec le tissu lisse de muscle de primat. La coexistence de la classe EMA d'IgG peut interférer la détection de la classe EMA d'IgA. Cependant, ceci se produit rarement comme :

1. IgG - EMA sont présents dans seulement 25% de patients de la maladie coeliaque,
2. IgG - les titres d'EMA sont habituellement beaucoup inférieurs à des titres d'IgA-EMA et
3. Les anticorps IgA sont habituellement d'un plus haut réactivité que des anticorps d'IgG.

Dans quelques patients présentant la maladie coeliaque et l'insuffisance d'IgA, les EMA-IgA sont absents. Cependant, de tels patients sont habituellement positifs pour l'EMA IgG.

Les patients présentant la maladie coeliaque à un régime libre de gluten pendant > 9 mois sont invariablement négatifs pour EMA.

En faisant un diagnostic, des résultats de tout l'essai en laboratoire doivent toujours être évalués avec toute l'histoire clinique du patient.

VALEURS ATTENDUES

Comme vu dans le tableau 1, EMA, comme détectés sur le muscle lisse de primat sont les marqueurs fortement spécifiques pour la dermatite herpétiforme et la maladie coeliaque. La présence d'EMA semble être liée à la pathologie intestinale dans la dermatite herpétiforme et la maladie coeliaque plutôt qu'aux lésions de peau dans le dernier, comme représenté sur le schéma 1 à la fin de ce document.

PERFORMANCES

L'ImmuGlo EMA kit, en utilisant le substrat lisse de muscle de primat et un conjugué polyvalent, a été comparé à un autre kit disponible dans le commerce à l'aide également d'un oesophage polyvalent de conjugué et de singe comme substrat. La comparaison a inclus un total de 68 sérums : 20 des patients présentant la maladie coeliaque médicalement suspectée et 48 des commandes normales. Des sérums ont été examinés selon le procédé recommandé par le fabricant. Une dilution de criblage de 2.5 a été employée et tous les sérums positifs pour EMA ont été titrés au point final. Les résultats étaient comme suit :

		IMMCO EMA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other/Autre/Otro	POS (+)	18	0	18
Andere/Altro/Otra	NEG (-)	2	48	50
EMA IFA	TOT (=)	20	48	68

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa:	97%
relative sensitivity/sensibilité relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivität/sensibilità relativa/sensibilidade relativa:	100%
relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo:	96%



ImmGlo™ Anti-Endomiso Anticuerpos (EMA) Test

IVD

IMMCO®
DIAGNOSTICS

REF 1114

EMA

48 Determinations

Test de detección de inmunofluorescencia indirecta para la detección y semicuantificación de los anticuerpos endomiso (EMA) en el suero humano, para la diagnosis de ciertas enteropatías sensibles al gluten, como la enfermedad celíaca y la dermatitis herpetiforme.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos de endomiso (EMA), según lo divulgado en la literatura, son detectados sobre todo en el músculo liso del esófago del mono por inmunofluorescencia indirecta. La detección de las ayudas de EMA en la diagnosis de las enteropatías sensibles al gluten, es decir. *enfermedad celíaca* (CD) y *dermatitis herpetiformis* (DH). Divulgan los pacientes con el CD y el DH para tener anticuerpos al endomiso, al reticulina y al gliadina¹⁻¹². Estos marcadores serológicos han sido incorporados recientemente en los criterios revisados para la diagnosis del CD por ESPGAN¹³. De los varios marcadores del anticuerpo del CD y del DH, EMA de la clase IgA se parecen ser el marcador más sensible y más específico. EMA de la clase IgG también ocurren cuando la clase EMA de IgA está en alto título o en los individuos que son IgA deficiente. Una disminución rápida de niveles de EMA resulta con adherencia a una dieta libre del gluten. Un desafío del gluten o una falta de mantener una dieta libre del gluten conduce al aspecto o a un aumento en EMA. Los pacientes en una dieta libre del gluten > 9 meses han reducido o los títulos negativos de EMA si adhieren a sus restricciones de la dieta^{1,6-8,10}.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Para la realización del método de inmunofluorescencia indirecta de este equipo tiene que incubarse el suero de los pacientes en secciones del tisular y, de este modo, permitir que los anticuerpos puedan unirse al sustrato. Cualquier anticuerpo no unido se elimina mediante lavado del portaobjetos. Los anticuerpos unidos de la clase IgG e IgA se detectan mediante incubación del sustrato con un conjugado antihumano marcado con fluoresceína. Las reacciones se visualizan en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. La presencia de EMA se demuestra mediante la presencia de fluorescencia de color verde en la guarnición endomiso del músculo liso se lía. Posteriormente se determina el título (valor recíproco de la mayor dilución que origina una reacción positiva) mediante diluciones seriadas¹⁴.

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

Almacenamiento y preparación

Almacenar todos los reactivos a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos pueden emplearse después de haber sido equilibrados a temperatura ambiente.

Materiales Suministrados

ImmGlo™ EMA IFA REF

1114

El kit contiene los suficientes reactivo para realizar 48 determinaciones.

8x	SORB SLD 6	Portaobjetos de 6 pocillos con substrato EMA .
1 x 0,5 ml	CONTROL + EMA *	Control positivo de EMA , suero humano
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Control negativo , suero humano
1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC *	Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)-IgA/IgG anti humana con BSA. Proteger de la luz
1 x 60 ml	BUF *	Diluyente de la muestra con BSA
2 viales	BUF WASH	Fosfato salino tamponado (PBS) . Disolver cada vial en 1 litro
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Medio de preparación . No congelar
1 x 1,0 ml	EVANS	Colorante de contraste azul de Evans
1 x 12	COVER SLD	Cubreobjetos

* PRECAUCIÓN - Contiene < 0.1% NaN_3

Material necesario, pero no suministrado

Microscopio de fluorescencia
Micropipetas o pipeta Pasteur
Pipetas serológicas
Placa de tinción (por ejemplo, frasco de Coplin)
Tubos de ensayo pequeños (por ejemplo, 13 x 75 mm) y gradilla de tubos de ensayo
Agua destilada o desionizada
Envase de 1 litro
Frasco de lavado
Toallas de papel
Cámara de incubación

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*. Todos los componentes de derivados sanguíneos humanos han sido ensayados respecto a la presencia de HbsAg, VHC, VIH-1 y 2 y el virus linfotrofo de células T humanas (VLTH-I), siendo negativos en los ensayos necesarios según la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos). Todas las muestras de suero y los derivados sanguíneos humanos deben tratarse como un material potencialmente peligroso, independientemente de su origen. En consecuencia, deben seguirse unas prácticas de laboratorio adecuadas durante el almacenamiento, dispensación y eliminación de dicho material ¹⁴.

PRECAUCIÓN - La azida sódica (NaN_3) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas muy explosivas. Después y desechar los líquidos, es necesario lavar con un volumen grande de agua para evitar la acumulación de azida. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere. En caso de ingestión, notificarlo inmediatamente al director del laboratorio o al centro toxicológico.

Para poder garantizar la obtención de resultados válidos, deben seguirse de forma exacta las instrucciones indicadas en este prospecto. No intercambiar componentes del equipo por otros diferentes que no tengan el mismo número de catálogo de IMMCO. No utilizar este

equipo después de la fecha de caducidad.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para la realización de esta determinación sólo debe utilizarse suero. Las muestras con hemólisis macroscópica, lipémicas o contaminadas por microorganismos pueden interferir en el funcionamiento del ensayo y, por tanto, no deben ser utilizadas. Almacenar las muestras a una temperatura de 2-8°C durante un período no superior a una semana. Cuando se desee un almacenamiento más prolongado, el suero debe congelarse a una temperatura de -20°C. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

PROCEDIMIENTO

Método de ensayo

A. Detección sistemática

1. Diluir 1:2,5 el suero de cada paciente con el diluyente de la muestra suministrado (0,2 ml de suero + 0,3 ml del diluyente). No diluir los Controles Positivo o Negativo. Guardar el suero no diluido para la determinación del título de anticuerpos si los resultados son positivos.
2. Permitir que los pocillos de los portaobjetos que contienen el sustrato se equilibren a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraer con cuidado los portaobjetos sin tocar el sustrato.
3. Etiquetar los portaobjetos y colocarlos en una cámara de incubación cubierta con toallas de papel humedecidas con agua para evitar la desecación.
4. Invertir el vial cuentagotas y presionar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) del Control Negativo en el pocillo nº 1. De forma similar, aplicar una gota del Control Positivo en el pocillo nº 2. Evitar llenar demasiado los pocillos.
5. Con el empleo de una micropipeta o una pipeta Pasteur, colocar 1 gota del suero diluido del paciente (aproximadamente 50 µl) en los restantes pocillos. Evitar llenar demasiado los pocillos.
6. Tapar la cámara de incubación e incubar los portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Quitar la tapa de la cámara de incubación. Coger el portaobjetos por el extremo y lavar suavemente con 10 ml de PBS mediante el empleo de una pipeta o lavar el portaobjetos en un vaso de precipitado lleno de PBS. No emplear un frasco de lavado. Transferir inmediatamente el portaobjetos al frasco de Coplin y dejarlo durante 10 minutos. Repetir el proceso con todos los portaobjetos restantes.
8. Extraer el portaobjetos del frasco de Coplin. Secar el extremo del portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Colocar el portaobjetos en la cámara de incubación, Invertir inmediatamente el vial cuentagotas del Conjugado y apretar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) en cada pocillo.
9. Repetir las etapas 7 y 8 con cada portaobjetos.
10. Tapar la cámara de incubación. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraer el portaobjetos del incubador. Sumergir el portaobjetos en un vaso de precipitado con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Colocar el portaobjetos en una cubeta de tinción llena con PBS durante 10 minutos. Al final del lavado puede añadirse, si se desea, 2-3 gotas de colorante de contraste azul de Evans. Repetir el proceso con los portaobjetos restantes. NOTA: un lavado inadecuado puede aumentar fluorescencia del fondo.
12. Extraer el portaobjetos de la cubeta de tinción. Secar el portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Para evitar que se seque el portaobjetos, realizar inmediatamente, mientras el portaobjetos todavía está húmedo, el proceso descrito en el apartado 13.
13. Añadir 3 gota del Medio de Preparación uniformemente en cubreobjetos y colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos. Evitar la aplicación de una presión excesiva y el

movimiento lateral del cubreobjetos.

14. Repetir las etapas 12 y 13 con cada portaobjetos.
15. Examinar el desarrollo de fluorescencia específica en un microscopio de fluorescencia a 200x o más aumentos.

Los portaobjetos pueden leerse al terminar su preparación. Sin embargo, debido a que el medio de preparación contiene un agente antidesdoblamiento, puede retrasarse la lectura durante un período de hasta 48 horas sin que se produzca una pérdida significativa de la intensidad de la tinción. Los portaobjetos deben almacenarse en la oscuridad a una temperatura de 2-8°C.

B. Determinación del punto de valoración (titulación)

Los sueros positivos durante el ensayo pueden valorarse de forma adicional, etapas 5- 13, para determinar su titulación. Cada ensayo debe incluir un control positivo y negativo. Realizar diluciones seriadas dobles a partir de 1:2,5. El título es el valor recíproco de la dilución más elevada que produzca una reacción positiva.

Preparación de las diluciones seriadas

Numerar cuatro tubos del 1 al 4. Añadir 0,3 ml del diluyente de la muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 4. Pipetear 0,2 ml del suero no diluido en el tubo 1 y mezclar minuciosamente. Transferir 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezclar meticulosamente. Continuar transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente tras la mezcla y, de este modo, conseguir las diluciones ilustradas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4
Suero	0,2 ml			
	+			
Diluyente tamponado	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↺	↺	↺
Transferencia	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Dilución final	1:2,5	1:5	1:10	1:20 etc.

CONTROL DE CALIDAD

En cada serie de ensayos debe incluirse un control positivo y negativo. El control negativo no debe mostrar fluorescencia específica de la guarnición endomiso del músculo liso se lía; por el contrario, el control positivo debe tener una intensidad de tinción igual o superior a 2+ del tubos de estas estructuras.

Cuando no se obtienen los resultados esperados, debe repetirse el ensayo. Los resultados anómalos con los controles pueden producirse por:

- Turbidez. Desechar y utilizar otro control.
- Problemas del sistema óptico del microscopio de fluorescencia. Estos problemas pueden incluir un alineamiento inadecuado, una lámpara con fecha posterior a la esperanza de vida útil, etc.
- Secado del portaobjetos durante el procedimiento.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de los ensayos de determinación de EMA deben documentarse como negativos (< 2,5) o positivos con título. Efectuar una lectura de la tinción de la guarnición endomiso del músculo liso se lía.

Ver La Foto 1. EMA reaccionan como red de líneas finas, irregulares alrededor del

sarcolemma de las fibrillas lisas individuales del músculo. Esto está en un contraste agudo a ASMA que reaccionen con el sarcoplasm. **Ver La Foto 2.**

Otros anticuerpos perceptibles además de los anticuerpos ASMA incluyen los anticuerpos antinucleares (ANA). La presencia de ASMA se sabe para causar los resultados negativos falsos para EMA. Si se detectan ASMA, después la muestra se debe probar en diluciones más altas. Las reacciones de ANA en tejido fino liso del músculo, cuando ocurren, son generalmente débiles y distribuidas escaso y, por lo tanto, poco probable causar resultados negativos falsos.

Consultar Photo 1 y Photo 2 en el final de las reacciones de este documento por ejemplo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunos casos, el suero positivo de EMA puede ser muy débil o negativo en la dilución inicial del ensayo (fenómeno prozona). En dichos casos dudosos, debe efectuarse el ensayo con diluciones superiores, y en los casos positivos, debe determinarse el título.

En algunos casos, la presencia de dos o más anticuerpos en el suero que reaccionan con el mismo substrato puede originar una interferencia de su detección mediante inmunofluorescencia. Esta interferencia puede impedir la detección de EMA u originar una supresión si el título del anticuerpo de interferencia tiene un título superior al de EMA. La causa más habitual del fenómeno de interferencia en los ensayos EMA es la coexistencia de ASMA.

Se recomienda que los sueros de los pacientes que también contienen ASMA estén probados más lejos en diluciones más altas. La clase IgA ASMA no es una ocurrencia común. La clase ASMA de IgG no bloquea IgA-EMA como el anterior reacciona con el sarcoplasm de los paquetes lisos del músculo y el últimos reaccionan con el endomisio del sarcolemma alrededor de los paquetes lisos del músculo. Los anticuerpos de antireticulina no interfieren con la reacción de EMA porque no reaccionan con el tejido fino liso del músculo del primate. La coexistencia de la clase EMA-IgG puede interferir con la detección de la clase EMA-IgA. Sin embargo, esto ocurre raramente como:

1. IgG-EMA están presentes en el solamente 25% de pacientes de la enfermedad celiaca,
2. IgG-EMA - los títulos son generalmente mucho más bajos que los títulos de IgA-EMA y
3. Los anticuerpos de IgA están generalmente de un reactividad y más alto que los anticuerpos IgG.

En algunos pacientes con enfermedad celiaca y la deficiencia de IgA, los EMA-IgA están ausentes. Sin embargo, tales pacientes son generalmente positivos para EMA-IgG.

Los pacientes con enfermedad celiaca en una dieta libre del gluten por > 9 meses son invariable negativos para EMA.

Al hacer una diagnosis, los resultados de toda la prueba de laboratorio se deben evaluar siempre junto con la historia clínica total del paciente.

VALORES ESPERADOS

Según lo visto en Table 1, EMA, según lo detectado en el músculo liso del primate son marcadores altamente específicos para la enfermedad celiaca y la dermatitis herpetiforme. La presencia de EMA se parece ser relacionada con la patología intestinal en la enfermedad celiaca y la dermatitis herpetiforme más bien que a las lesiones de piel en el último, como en Figure 1 en el extremo de este documento.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL FUNCIONAMIENTO

El ImmuGlo EMA kit, usando el sustrato liso del músculo del primate y una conjugación polivalente, fue comparado con otro kit comercialmente disponible también que usaba un esfago polivalente de la conjugación y del mono como sustrato. La comparación incluyó un total de 68 sueros: 20 de pacientes con enfermedad celiaca clínico sospechada y 48 de controles normales. Los sueros fueron probados según el procedimiento recomendado por el fabricante. Una dilución de la investigación de 2,5 fue utilizada y todos los sueros positivos para EMA fueron titulados a la punto final. Los resultados eran como sigue:

		IMMCO EMA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other/Autre/Otro	POS (+)	18	0	18
Andere/Altro/Otra	NEG (-)	2	48	50
EMA IFA	TOT (=)	20	48	68

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa:	97%
relative sensitivity/sensibilit� relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivität/sensibilit� relativa/sensibilidade relativa:	100%
relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo:	96%



ImmuGlo™ Anti-Endomysium Antikörper (EMA) Test

IVD

IMMCO®
DIAGNOSTICS

REF 1114

EMA

48 Determinations

Für den Nachweis und die semiquantitative Bestimmung von Anti-Endomysium Antikörper (EMA) mit der indirekten Immunfluoreszenz. EMA dient der Diagnose von bestimmten gluteninduzierten Enteropathien wie Zöliakie und Dermatitis herpetiformis.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Endomysium Antikörper (EMA), wie in der Literatur berichtet, werden hauptsächlich auf dem glatten Muskel des Affeosophagus durch indirekte Immunofluoreszenz ermittelt. Die Abfragung der EMA Hilfsmittel in der Diagnose von gluteninduzierte Enteropathien, Zöliakie (CD) und *Dermatitis Herpetiformis* (DH). Patienten mit CD und DH werden berichtet, um Antikörper zu Endomysium, zu Reticulin und zu Gliadin zu haben¹⁻¹². Diese serologischen Markierungen sind vor kurzem in die korrigierten Kriterien für die Diagnose der CD durch das ESPGAN enthalten worden¹³. Von den verschiedenen Antikörpermarkierungen der CD und des DH, scheinen EMA der IgA Kategorie, die empfindlichste und spezifischste Markierung zu sein. EMA der IgG Kategorie treten auch auf, wenn IgA Kategorie EMA im hohen Titer oder in den Einzelpersonen sind, die unzulängliches IgA sind. Eine schnelle Abnahme an den EMA Niveaus resultiert mit Haftfähigkeit zu einer freien Diät des Glutens. Eine Glutenherausforderung oder eine Störung, eine freie Diät des Glutens beizubehalten führt zu das Aussehen oder eine Zunahme der EMA Titer. Patienten auf einer freien Diät des Glutens > 9 Monate haben sich oder negative EMA Titer verringert, wenn sie ihre Diätbeschränkungen befolgen^{1,6-8,10}.

TESTPRINZIP

Bei dem in diesem Test eingesetzten indirekten Immunfluoreszenzverfahren werden Patientenserum mit Gewebe- Abschnitte inkubiert, um die Bindung von in den Seren vorhandenen Autoantikörpern an die Zellen zu ermöglichen. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Gebundene Antikörper vom Typ IgG und IgA werden durch Inkubation der Zellen mit Fluorescein-markiertem anti-Human nachgewiesen. Das Reaktionsmuster wird unter einem Fluoreszenzmikroskop bewertet, das mit den entsprechenden Filtern ausgerüstet ist. Das Vorhandensein von EMA zeigt sich durch eine apfelgrüne vom endomysialen Futter des glatten Muskels rollt zusammen Fluoreszenz. Anschließend kann der Titer (der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, die eine positive.

PRODUKTINFORMATION

Lagerung und Handhabung

Alle Reagenzien sind bei 2-8°C zu lagern. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, nachdem sie auf Raumtemperatur gebracht wurden.

In der Testpackung vorhandenes Material

ImmuGlo™ EMA IFA REF

1114

Installationssätze enthalten genügende Reagenzien, um 48 Ermittlungen jede durchzuführen.

8x	SORB SLD 6	Objektträger zu 6 Auftragstellen beschichtet mit EMA.
1 x 0.5 ml	CONTROL + EMA *	EMA Positive Kontrolle, Humanserum mit BSA
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Negative Kontrolle, Humanserum mit BSA
1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC *	FITC-Konjugat, Anti-Human-IgA/ IgG mit BSA. Lichtgeschützt aufbewahren
1 x 60 ml	BUF *	Probendiluent mit BSA
2 vials	BUF WASH	Phosphatgepuffertes Kochsalz (PBS). Inhalt eines Fläschchens in 1 Liter auflösen
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Eindeckmittel. Nicht einfrieren
1 x 1.0 ml	EVANS	Evans Blau Färbemittel
1 x 12	COVER SLD	Deckgläschen

* enthält < 0.1% NaN_3

Zusätzlich benötigtes Material

Fluoreszenzmikroskop
Mikropipetten oder Pasteurpipetten
Kolbenhubpipette
Färbetrog (z.B. nach Coplin)
Kleine Reagenzröhrchen (z.B. 12x75 mm) und dazu passende Gestelle
Destilliertes oder entionisiertes Wasser
Behälter, 1 Liter
Papierhandtücher
Feuchte Kammer

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für In-vitro-Diagnostik. Alle Bestandteile menschlichen Ursprungs wurden auf das Vorhandensein von HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV-1/HIV-2 und Anti-HTLV-1 mit FDA-zugelassenen Tests untersucht und für negativ befunden. Alle Humansen und Produkte menschlichen Ursprungs sollten ungeachtet ihrer Herkunft als potentiell gefährlich gehandhabt werden. Diese Materialien und ihre Behältnisse sind nach geltenden Vorschriften und Richtlinien zu lagern und zu beseitigen ¹⁴.

ACHTUNG - Natriumazid (NaN_3) kann mit Kupfer und Blei in Leitungen und Lötstellen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren. Um eine Bildung solcher Metallazide zu vermeiden, müssen Ausgüsse nach dem Ausgießen azidhaltiger Lösungen mit reichlich Wasser gespült werden. Natriumazid kann beim Verschlucken giftig sein. Fälle von Verschlucken sofort dem Laborleiter oder der Giftzentrale melden.

Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, ist das Testprotokoll unbedingt einzuhalten. Falls Kitreagenzien ersetzt werden müssen, sollten nur Artikel von IMMCO der gleichen Artikelnummer verwendet werden. Keine verfallenen Reagenzien verwenden.

PROBENGEWINNUNG UND HANDHABUNG

Bei diesem Verfahren sollte nur Serum verwendet werden. Deutlich hämolytische, lipämische oder mikrobiell kontaminierte Proben können die Leistung dieses Tests beeinträchtigen und sollten daher nicht verwendet werden. Proben sollten nicht länger als eine Woche bei 2-8 °C gelagert werden. Bei längerer Lagerung sollten sie bei -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Testmethode

A. Screening

1. Jedes Patientenserum mit dem Probendiluent aus dem Kit 1:2,5 (0.2ml Serum + 0.3 Diluent) verdünnen. Die positiven und negativen Kontrollen nicht verdünnen. Die unverdünnten Nativseren aufbewahren, um bei positivem Suchtestergebnis gegebenenfalls den Antikörpertiter bestimmen zu können.
2. Beutel mit den beschichteten Objektträgern auf Raumtemperatur bringen (10-15 Minuten). Objektträger vorsichtig entnehmen, ohne die Beschichtung zu berühren.
3. Objektträger beschriften und, um ein Austrocknen der Beschichtung zu verhindern, in eine feuchte Kammer legen.
4. Von den Tropffläschchen mit der Negativen und Positiven Kontrolle jeweils 1 Tropfen (etwa 50 ml) auf die Auftragstellen #1 bzw. #2 ausdrücken. Auftragstellen nicht überfüllen.
5. Mit einer Mikro- oder Pasteurpipette 1 Tropfen verdünntes Patientenserum (etwa 50 µl) auf die weiteren Auftragstellen geben. Auftragstellen nicht überfüllen.
6. Die Objektträger in der abgedeckten feuchten Kammer 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Jeweils einen Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und sorgfältig mit ca. 10 ml PBS aus einer Pipette spülen; alternativ Objektträger in einem Becher mit PBS spülen. Keine Spritzflasche verwenden. Objektträger sofort in einen Färbetrog mit PBS für 10 Minuten stellen. Mit den anderen Objektträgern ebenso verfahren.
8. Objektträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objektträgers gegen ein Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Objektträger in die feuchte Kammer legen und sofort vom Tropffläschchen mit Konjugat 1 Tropfen (ca. 50 µl) auf jede Auftragstelle ausdrücken.
9. Die Schritte 7 und 8 mit jedem Objektträger einzeln durchführen.
10. Feuchte Kammer abdecken und Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Jeweils einen Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und in einen Becher mit PBS eintauchen, um Überschuß an Konjugat zu entfernen. Objektträger 10 Minuten in einen Färbetrog mit PBS stellen. Falls Gegenfärbung gewünscht ist, können 2-3 Tropfen Evans Blau Färbemittel pro Trog hinzugefügt werden. Mit den anderen Objektträgern ebenso verfahren. HINWEIS: Unsachgemäßes Waschen kann Hintergrundfluoreszenz erhöhen.
12. Objektträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objektträgers gegen ein Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Um ein Austrocknen der Beschichtung zu vermeiden, sofort mit Schritt 13 fortfahren.
13. 3 Tropfen des Eindeckmittels sorgfältig auf Deckgläschen gleichmäßig geben und ein Deckgläschen auflegen. **Leicht** andrücken und **seitliche** Bewegung des Deckgläschens vermeiden.
14. Die Schritte 12 und 13 mit jedem Objektträger einzeln durchführen.
15. Auf spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200facher Vergrößerung auswerten.

Die Objektträger können sofort nachdem sie angefertigt wurden ausgewertet werden. Weil

das Eindeckmittel einen Stoff enthält, der einem Ausbleichen entgegenwirkt, können die Objektträger jedoch bis 48 Std. später ausgewertet werden, ohne daß die Intensität der Fluoreszenz signifikant abklingt. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8°C gelagert werden.

B. Titerbestimmung

Bei einem im Suchtest positiven Serum kann nach Durchführung der **Schritte** 5 bis 13 der Titer bestimmt werden. Zu diesem Zweck ist ausgehend von einer 1:2,5-Verdünnung eine Reihenverdünnung zu erstellen.

Bei jedem Testlauf sollten die positive und negative Kontrolle mitgeführt werden. Der Titer ergibt sich aus dem reziproken Wert der höchsten Verdünnung, die ein positives Ergebnis zeigt.

Herstellung einer Reihenverdünnung

Vier Röhrrchen mit 1 bis 4 beschrifteten. Vom Probendiluent 0,3 ml in Röhrrchen 1 und jeweils 0,2 ml in Röhrrchen 2 bis 4 geben. 0,2 ml unverdünntes Serum in Röhrrchen 1 pipettieren und gründlich durchmischen. Aus Röhrrchen 1 0,2 ml ins Röhrrchen 2 überführen und gründlich durchmischen. Die Verdünnungsreihe wie in der folgenden Tabelle dargestellt fortführen, indem nach Durchmischen jeweils 0,2 ml von einem Röhrrchen in das nächste überführt werden.

Röhrrchen	1	2	3	4
Serum	0,2 ml			
	+			
Probendiluent	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻
Zu überführen		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Endverdünnung	1:2,5	1:5	1:10	1:20 etc.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl eine positive wie eine negative Kontrolle mitgeführt werden. Die negative Kontrolle sollte keine spezifische Fluoreszenz der endomysium Futter der glatten Muskelbündel zeigen. Sollte die positive Kontrolle eine Fluoreszenzintensität von mindestens 2+ im Schläuche der Strukturen zeigen. Werden die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten, sollte der Testlauf wiederholt werden. Sind die Ergebnisse mit den Kontrollen auch dann nicht wie erwartet, kann dies folgende Ursachen haben:

- Trübungen. Kontrolle(n) verwerfen und eine neue verwenden.
- Probleme mit der Optik des Mikroskops, wie z.B.: unsachgemäße Ausrichtung, Lampe zu alt, usw.
- Objektträgerbeschichtung während Testdurchführung ausgetrocknet.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der EMA-Untersuchung sollten als negativ (Titer <1:2,5) bzw. positiv einschließlich Titer angegeben werden. Die Präparate sollten hinsichtlich einer spezifischen Fluoreszenz der endomysium Futter der glatten Muskelbündel zeigen.

Foto 1 Sehen. EMA reagieren als Netz der dünnen, unregelmäßigen Linien um das Sarkolemma der einzelnen glatten Muskelfäserchen. Dieses ist im scharfen Kontrast zu ASMA, die mit dem sarcoplasm reagieren. **Foto 2 Sehen.**

Andere nachweisbare Antikörper außer ASMA schließen ANA mit ein. Das Vorhandensein von ASMA bekannt, um falsche negative Resultate für EMA zu verursachen. Wenn ASMA ermittelt werden, dann sollte die Probe an den höheren Verdünnungen geprüft werden.

ANA Reaktionen auf glattem Muskelgewebe, wenn sie auftreten, sind normalerweise schwach und spärlich folglich und verteilt unwahrscheinlich, falsche negative Resultate zu verursachen.

Photo 1 und Photo 2 am Ende der Reaktionen dieses Dokumentes zum Beispiel beraten.

GRENZEN DES VERFAHRENS

In seltenen Fällen können hochtitrige EMA-Seren mit der ursprünglichen Suchtestverdünnung negativ bis schwach positiv reagieren (Prozonphänomen). Im Zweifelsfall sollten solche Seren mit einer höheren Verdünnung getestet und bei positivem Ergebnis titriert werden. Enthält ein Patientenserum zwei oder mehrere Antikörper, die mit dem selben Substrat reagieren, so kann ihr Nachweis mit der indirekten Immunfluoreszenz aufgrund von Interferenz erschwert sein. Diese Interferenz kann den Nachweis von EMA entweder vereiteln oder einen zu niedrigen EMA-Titer bewirken, falls der Titer des interferierenden Antikörpers höher ist. Die häufigste Ursache von Interferenz im EMA-Test ist die Koexistenz von ASMA.

Es wird empfohlen, daß Patienten Seren, die auch ASMA enthalten, weiter an den höheren Verdünnungen geprüft werden. IgA Kategorie ASMA sind nicht ein allgemeines Auftreten. IgG Kategorie ASMA blockieren IgA-EMA nicht als das ehemalige reagieren mit dem sarcoplasm der glatten Muskelbündel und die letzten reagieren mit dem endomysium des Sarkolemmas um die glatten Muskelbündel. Anti-reticulin Antikörper behindern nicht die Reaktion von EMA, weil sie nicht mit glattem Muskelgewebe des Primas reagieren. Die Koexistenz von IgG - EMA kann die Abfragung von IgA-EMA behindern. Jedoch tritt dieses selten wie auf:

1. IgG - EMA sind in nur 25% von CD- Patienten anwesend,
2. IgG - EMA Titer sind normalerweise viel niedriger als IgA-EMA Titer und
3. IgA sind normalerweise von der höheren Reaktivität als IgG.

Bei einigen Patienten mit abdominaler Krankheit und IgA Mangel, sind das IgA-EMA abwesend. Jedoch sind solche Patienten normalerweise für IgG - EMA positiv.

Patienten mit CD auf einer freien Diät des Glutens für > 9 Monate sind unveränderlich für EMA negativ.

Wenn man eine Diagnose bildet, müssen Resultate alles Laborversuchs zusammen mit der klinischen totalgeschichte des Patienten immer ausgewertet werden.

ERWARTETE WERTE

Wie in Table 1 gesehen, sind EMA, wie auf glattem Muskel des Primas ermittelt in hohem Grade spezifische Markierungen für CD und DH. Das Vorhandensein von EMA scheint, mit der intestinalen Pathologie in der CD und DH zusammenzuhängen anstatt zu den Hautverletzungen in der letzten. Siehe Figure 1 am Ende dieses Dokumentes.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Der ImmuGlo EMA Test Kit mit glattem Muskelsubstrat des Primas und einem vielwertigen Paronym, wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Installationsatz verglichen, der auch einen vielwertigen Paronym- und Affeösophagus als Substrat verwendet. Der Vergleich schloß eine Gesamtmenge von 68 Seren ein: 20 von den Patienten mit klinisch vermuteter abdominaler Krankheit und 48 von den normalen Kontrollen. Seren wurden entsprechend dem Verfahren geprüft, das durch den Hersteller empfohlen wurde. Eine Siebung-Verdünnung von 2.5 wurde verwendet und alle Seren, die für EMA positiv sind, wurden zum Endpunkt titriert. Die Resultate waren, wie folgt:

		IMMCO EMA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other/Autre/Otro	POS (+)	18	0	18
Andere/Altro/Otra	NEG (-)	2	48	50
EMA IFA	TOT (=)	20	48	68

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa: 97%

relative sensitivity/sensibilit  relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivit t/sensibilit  relativa/sensibilidade relativa: 100%

relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo: 96%



ImmuGlo™ ANTICORPI ANTI-ENDOMISIO (EMA)

REF
IVD

Catalogo no. 1114

Dosaggio in immunofluorescenza indiretta per l'individuazione e la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi anti-endomysio (EMA) nel siero umano. Gli EMA sono presenti nel siero dei pazienti con certe enteropatie sensibili al glutine quali la malattia celiaca e la dermatite erpetiforme.

CARATTERISTICHE GENERALI

Gli anticorpi di Endomysium (EMA), come segnalato nella letteratura, sono rilevati soprattutto sul muscolo liscio dell'esofago della scimmia dall'immunofluorescenza indiretta. La rilevazione dei sussidi di EMA nella diagnosi di enteropatia sensibile al glutine, cioè *malattia celiaca* (CD) e *dermatitis herpetiformis* (DH). I pazienti con il CD ed il DH sono segnalati per avere anticorpi al endomysium, al reticulina ed alla gliadina¹⁻¹². Questi indicatori sierologici recentemente sono stati incorporati nei test di verifica modificati per la diagnosi del CD dal ESPGAN¹³. Di vari indicatori dell'anticorpo del CD e del DH, EMA del tipo di IgA sembrano essere l'indicatore più sensibile e più specifico. EMA IgG inoltre accadono quando il codice categoria EMA IgA è nell'alto titolo o in individui che sono IgA carente. Una diminuzione veloce nei livelli di EMA risulta con aderenza ad una dieta libera del glutine. Una sfida del glutine o un'omissione effettuare una dieta libera del glutine conduce all'apparenza o ad un aumento nei EMA. I pazienti su una dieta libera del glutine > 9 mesi hanno ridotto o titoli negativi di EMA se si aderiscono alle loro limitazioni di dieta^{1,6-8,10}.

PRINCIPIO DEL METODO

Nella metodica in immunofluorescenza indiretta utilizzata in questo kit, i sieri dei pazienti vengono incubati su sezioni del tessuto per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Tutti gli anticorpi non legati vengono eliminati sciacquando il vetrino, mentre gli anticorpi legati del tipo IgA e IgG vengono individuati mediante incubazione del substrato con coniugato anti umana, marcato con fluoresceina. Per osservare le reazioni si utilizza un microscopio a fluorescenza dotato di filtri adatti. Una fluorescenza verde mela rivestimento endomysio dei pacchi lisci del muscolo conferma la presenza di EMA. Mediante l'analisi di diluizioni seriali si determina quindi il titolo (il reciproco della diluizione più elevata che causa una reazione positiva).¹⁴

CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a una temperatura di 2-8°C. I reagenti sono pronti per l'uso dopo averli portati a temperatura ambiente.

Materiali forniti

ImmuGlo™ EMA IFA REF 1114

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 48 determinazioni ciascuno.

8 x	SORB SLD 6
1 x 0,5 ml	CONTROL + EMA *
1 x 0,5 ml	CONTROL - * *
1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC *
1 x 60 ml	BUF *
2 flaconcini	BUF WASH
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *
1 x 1,0 ml	EVANS
1 x 12	COVER SLD

* Contiene < 0.1% NaN₃

Vetrini-substrato di muscolo liscio con 6 pozzetti

Controllo positivo EMA, siero umano

Controllo negativo, siero umano

Coniugato FITC anti-umana.
Tenere lontano dalla luce.

Diluyente per campioni

Tampone fosfato-salino (PBS).
Ricostituire ciascun flaconcino con 1 litro d'acqua

Mezzo Montante. Non congelare.

Blu di Evans

Vetrini coprioggetto

Materiali necessari ma non forniti

Microscopio a fluorescenza
Micropipetta o pipetta Pasteur
Pipette sierologiche
Piastra di colorazione (ad esempio vaschetta di Coplin)
Piccole provette (ad es. 13 x 75 mm) e porta provette
Acqua distillata o deionizzata
Contenitore da 1 litro
Bottiglia di lavaggio
Carta assorbente
Incubatore

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. Il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato controllato ed è risultato negativo ai test richiesti dalla FDA per la presenza dell'HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I. Tuttavia, maneggiare tutti i campioni di siero umano e i prodotti di origine umana come fonte potenziale di infezione, indipendentemente dalla loro origine, seguendo le normali pratiche di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e l'eliminazione di questi materiali¹⁴. **ATTENZIONE** - La sodio azide (NaN₃) può dar luogo a reazioni chimiche pericolose. Per lo smaltimento dei residui delle analisi attenersi scrupolosamente alle norme CDC e alle norme di legge in materia. La sodio azide è tossica, se ingerita; in questo caso, informare immediatamente il responsabile del laboratorio o un centro per casi di avvelenamento.

Al fine di assicurare risultati validi, si raccomanda di attenersi alle istruzioni riportate in questo inserto. Non scambiare i componenti del kit se non con quelli aventi lo stesso numero di catalogo della IMMCO. Non utilizzare oltre la data di scadenza.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare soltanto campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o contaminati possono influenzare i risultati del test e vanno scartati. Conservare i campioni a una temperatura di 2-8°C per non oltre una settimana. Per periodi di conservazione

più lunghi, congelare il siero a -20°C , evitando di congelare i campioni più volte.

PROCEDURA

Metodica d'analisi

A. Screening

1. Diluire ciascun siero di paziente 1:2,5 con il Diluente per Campioni fornito (20 μl di siero + 0,3 ml di Diluente). **Non diluire i Controlli Positivi o Negativi.** Conservare i sieri non diluiti per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che i sacchetti contenenti i vetrini-substrato raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti, quindi estrarre i vetrini facendo attenzione a non toccare il substrato.
3. Marcare i vetrini e porli in una camera umida.
4. Capovolgere il flaconcino contagocce e versare delicatamente 1 goccia (circa 50 μl) del Controllo Negativo nel pozzetto no. 1. Allo stesso modo versare 1 goccia del Controllo Positivo nel pozzetto no. 2, evitando di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Con una micropipetta o con la pipetta Pasteur, versare 1 goccia del siero diluito del paziente (circa 50 μl) negli altri pozzetti, evitando di riempirli eccessivamente.
6. Mettere il coperchio sulla camera umida ed incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
7. Togliere un vetrino dalla camera umida. Tenendo il vetrino per l'estremità della linguetta, sciacquarlo delicatamente con circa 10 ml di PBS utilizzando una pipetta o sciacquarlo in un becher pieno di PBS. Non utilizzare la bottiglia di lavaggio. Trasferire il vetrino immediatamente nella vaschetta di Coplin e lavare per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
8. Togliere il/i vetrino/i dalla vaschetta di Coplin. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Porre il vetrino nella camera umida. Capovolgere immediatamente il flaconcino contagocce del Coniugato e versarne delicatamente 1 goccia (circa 50 μl) in ciascun pozzetto.
9. Ripetere i punti 7 e 8 per ciascun vetrino.
10. Riporre il coperchio sulla camera umida ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
11. Togliere un vetrino dalla camera umida e tenendolo per l'estremità della linguetta, immergerlo in un becher pieno di PBS per togliere il coniugato in eccesso. Porre il/i vetrino/i in una piastra di colorazione piena di PBS per 10 minuti. Se si desidera, si possono aggiungere 2-3 gocce di Blu di Evans al lavaggio finale. Ripetere per gli altri vetrini. **NOTA:** Un lavaggio scorretto può aumentare la fluorescenza della priorità bassa.
12. Togliere un vetrino dalla piastra di colorazione. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Per evitare che il vetrino si secchi, passare immediatamente al punto 13 mentre è ancora bagnato.
13. Montare il vetrino coprioggetto versando delicatamente 3 **goccia** uniformemente di Terreno di allestimento su vetrino coprioggetto, quindi porre il coprioggetto sul vetrino. Non applicare eccessiva pressione ed evitare che il coprioggetto si sposti lateralmente.
14. Ripetere i punti 12 e 13 per ciascun vetrino.
15. Esaminare la fluorescenza specifica con un microscopio a fluorescenza a un ingrandimento di almeno 200x. I vetrini si possono leggere appena vengono preparati. Tuttavia, grazie a un agente anti evanescenza presente nel liquido di montaggio, non si verifica alcuna perdita significativa di intensità di colorazione, se la lettura viene posticipata fino a 48 ore. I vetrini devono essere conservati al buio a una temperatura di $2-8^{\circ}\text{C}$.

B. Determinazione dell'endpoint (Titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere ulteriormente analizzato seguendo i punti da 5 a 13 per determinarne il titolo. Ciascuna sessione analitica deve includere i Controlli

Positivi e Negativi. Effettuare diluizioni seriali doppie partendo da 1:2,5. Il reciproco della diluizione più elevata che produce una reazione positiva è il titolo.

Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare quattro provette da 1 a 4. Aggiungere 0,3 ml di Diluente per Campioni alla provetta 1 e 0,2 ml alle 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 all'altra dopo aver mescolato per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

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

CONTROLLO DI QUALITA'

Ciascuna sessione analitica deve comprendere sia un Controllo Positivo che uno Negativo. Il Controllo Negativo non deve mostrare alcuna fluorescenza specifica del rivestimento endomysio dei pacchi lisci del muscolo, mentre il Controllo Positivo deve avere un'intensità di colorazione dei tubi di queste strutture di almeno 2+ con il controllo positivo EMA.

Se non si ottengono i risultati attesi, bisognerà ripetere l'analisi. Se continuano a verificarsi risultati inadeguati con i controlli, le cause possono essere:

- Torbidità. Scartare e utilizzare un altro controllo.
- Problemi al sistema ottico del microscopio a fluorescenza, quali allineamento non corretto, bulbo scaduto, ecc.
- Essiccamento del vetrino durante la procedura.

RISULTATI

I risultati delle prove per EMA dovrebbero essere segnalati come la negazione (< 2.5), più grande o uguale positivo a 20, o preferibilmente, positivo con il titolo.

Colto per la macchiatura specifica del rivestimento di endomysio del muscolo liscio impacchettato. Vedere Photo 1 all'estremità di questo documento. EMA reagiscono come rete delle linee sottili e irregolari intorno al sarcolemma di diverse fibre lisce del muscolo. Ciò è in anticorpi anti-lisci taglienti del muscolo di contrasto che reagiscono con il <<sarcoplasm>>. Vedere Photo 2 all'estremità di questo documento.

Altri anticorpi rilevabili oltre a ASMA includono gli anticorpi antinucleari (ANA). La presenza di ASMA è conosciuta per causare i risultati negativi falsi per EMA. Se ASMA sono rilevati, quindi il campione dovrebbe essere esaminato alle più alte diluizioni¹. Le reazioni del ANA sul tessuto liscio del muscolo, sono solitamente deboli ed improbabili causare i risultati negativi falsi.

LIMITI DELLA PROCEDURA

In alcuni casi, i sieri EMA positivi possono essere o molto deboli o negativi alla diluizione iniziale di screening (fenomeno di prozona). Quando si verificano questi casi dubbi, i sieri dovranno essere esaminati a diluizioni maggiori e, se positivi, dovranno essere determinati i titoli anticorpali.

In alcuni casi la presenza in un siero di due o più anticorpi reattivi con lo stesso substrato può causare un'interferenza nella loro individuazione mediante immunofluorescenza. Tale interferenza può provocare il mancato rilevamento degli EMA o la soppressione del loro titolo se gli anticorpi che interferiscono hanno un titolo maggiore degli EMA.

La causa più comune del fenomeno d'interferenza nei test EMA è la coesistenza degli ASMA.

I sieri che contiene la ASMA deve essere esaminata ancora alle più alte diluzioni. IgA-ASMA non è comune. IgG-ASMA non ostruisce IgA-EMA. Gli anticorpi anti-reticolina (ARA) non interferiscono con la reazione di EMA perché non reagiscono con il tessuto liscio del muscolo del primate. La coesistenza del codice categoria EMA di IgG può interferire con la rilevazione di IgA-EMA. Tuttavia, questo accade raramente come:

1. IgG-EMA sono presenti in soltanto 25% dei pazienti del CD,
2. IgG - i titoli di EMA sono solitamente molto più bassi dei titoli di IgA-EMA e
3. Gli anticorpi di IgA sono solitamente più reattivi degli anticorpi di IgG.

In alcuni pazienti con il CD e la mancanza di IgA, il IgA-EMA è assente. Tuttavia, tali pazienti sono solitamente positivi per il codice categoria EMA di IgG.

I pazienti con il CD su una dieta libera del glutine per > 9 mesi sono invariabilmente negativi per EMA.

Nel fare una diagnosi, i risultati di tutta la prova di laboratorio devono essere valutati sempre con la storia clinica totale del paziente.

VALORI ATTESI

Come visto in Table 1 (all'estremità di questo documento), EMA sono altamente specifici per il CD ed il DH. La presenza di EMA sembra essere collegata con la patologia intestinale sia in CD che DH piuttosto che alle lesioni cutanee nel posteriore, come rappresentato nella Figure 1 all'estremità di questo documento.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL METODO

Il corredo di ImmuGlo EMA è stato paragonato ad un altro corredo disponibile in commercio. Il confronto ha incluso un totale di 68 sieri: 20 dai pazienti con ritenuto sospetto del CD e 48 dai comandi normali. Una diluzione di 2.5 è stata usata. I sieri positivi per EMA sono stati titolati al punto finale. I risultati seguono.

		IMMCO EMA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other/Autre/Otro	POS (+)	18	0	18
Andere/Altro/Otra	NEG (-)	2	48	50
EMA IFA	TOT (=)	20	48	68

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa:	97%
relative sensitivity/sensibilit� relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivit�t/sensibilit� relativa/sensibilidade relativa:	100%
relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo:	96%



ImmuGlo™ Anti-Endomysium Anticorpos (EMA) Test

IVD

IMMCO
DIAGNOSTICS

REF 1114

EMA

48 Determinations

Teste de anticorpos de imunofluorescência indirecta para a detecção e semi-quantificação de anticorpos anti-endomysium (EMA) no soro humano. EMA ajuda no diagnóstico de doença celíaca (CD) e *dermatitis herpetiformis* (DH).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos de Endomysium (EMA), como relatado na literatura, são detectados primeiramente no músculo liso do esophagus do macaco pelo imunofluorescente indirecta. A detecção dos EMA ajuda no diagnóstico de doença celíaca (CD) e *dermatitis herpetiformis* (DH). Os pacientes com CD e DH são relatados para ter anticorpos ao endomysium, ao reticulín e ao gliadín ¹⁻¹². Estes marcadores têm sido incorporados recentemente nos critérios revisados para o diagnóstico do CD pelo ESPGAN ¹³. Dos vários marcadores do anticorpos do CD e do DH, EMA da classe de IgA parecem ser o marcador o mais sensível e o mais específico. EMA IgG ocorrem também quando a classe EMA de IgA está no titulação elevado ou nos indivíduos que são IgA deficient. Uma diminuição rápida em níveis de EMA resulta com manter-se a uma dieta livre do glúten. Um desafio do glúten ou uma falha manter uma dieta livre do glúten conduzem à aparência ou a um aumento em EMA. Os pacientes em uma dieta livre do glúten > 9 meses reduziram-se ou titulação negativos de EMA se aderissem a suas limitações da dieta ^{1,6-8,10}.

PRINCÍPIOS DO MÉTODO

No método de imunofluorescência indirecto usado neste kit, o soro dos pacientes é incubado em seções do tecido para permitir a ligação de anticorpos ao substrato. Quaisquer anticorpos livres são removidos através da lavagem da lâmina. Os anticorpos ligados da classe IgG e IgA são detectados através da incubação do substrato com conjugado anti-humano fluoresceínico. As reacções são observadas ao microscópio fluorescente equipado com filtros apropriados. A presença de EMA é demonstrada por uma fluorescência verde maçã o forro endomysium do músculo liso empacota. A titulação (o recíproca da maior diluição com reacção positiva) é então determinado através da testagem de várias diluições ¹⁴.

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

Armazenamento e preparação

Guardar todos os reagentes a 2-8°C. Os reagentes estão prontos a usar após ficarem à temperatura ambiente.

Material fornecido

ImmuGlo™ EMA IFA REF

1114

Os jogos contêm reagentes suficientes para executar 48 determinações cada uma.

8x	SORB SLD 6	Lâminas de substrato EMA de 6 poços
1 x 0,5 ml	CONTROL + EMA *	Controlo positivo EMA, soro humano.
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo, soro humano.
1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC *	Conjugado ITCF IgA/IgG anti-humano. Proteger da luz.
1 x 60 ml	BUF *	Diluyente de amostras com BSA
2 vials	BUF WASH	Tampão fosfato alcalino (PBS). Dissolver cada frasco num litro.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Meio de suporte. Não congelar.
1 x 1,0 ml	EVANS	Contra corante Azul de Evans.
1 x 12	COVER SLD	Tampas

* Contem < 0.1% NaN₃

Material necessário mas não fornecido

Microscópio de fluorescência
 Micropipeta ou pipeta Pasteur
 Pipetas serológicas
 Prato de coloração (ex: Coplin)
 Tubos pequenos (ex: 13 x 75 mm) e suportes de tubos
 Água destilada ou desionizada
 Contentor de 1 litro
 Garrafa de lavagem
 Toalhetes
 Câmara de incubação

AVISOS E PRECAUÇÕES

Para o diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes derivados dos humanos utilizados foram testados para HbsAg, VHC, HIV-1 e 2 e HTLV-I e deram negativos nos testes FDA. Todos os espécimens de soro humano e produtos derivados dos humanos devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem-se respistar as boas práticas laboratoriais na armazenagem, distribuição e manuseamento destes materiais¹⁴. AVISO: A azida sódica (NaN₃) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação de tais azidas. A azida sódica pode ser tóxica se ingerida. Se ingerida, contacte imediatamente o director de laboratório ou um centro de envenenamento.

As instruções devem ser seguidas à risca de forma a assegurar resultados válidos. Não trocar componentes dos kits com outros de outras origens. Todos devem ser do mesmo nº da IMMCO. Não utilizar se estiverem fora do prazo.

RECOLHA DE AMOSTRAS E PREPARAÇÃO

Só os espécimens séricos devem ser utilizados para este teste. Os espécimens hemolizados, lipémicos ou contaminados microbianamente podem interferir com a performance do teste e não devem ser usados. Armazenar a 2-8°C durante apenas uma semana. Para armazenamento mais longo devem ser congelados a -20°C. Evitar repetidas congelações e descongelações.

MODO OPERATÓRIO

Método do teste

A. Despistagem

1. Diluir cada soro 1:2,5 com o Diluente de amostras fornecido (0,2 ml soro + 0,3 ml Diluente). Não diluir os Controlos Negativo e Positivo. Guardar o soro não diluído para determinar a titulação de anticorpos, se os testes de despistagem forem positivos.
2. Deixar as bolsas com as lâminas de substrato à temperatura ambiente 10-15 minutos. Retirar as lâminas sem tocar no substrato.
3. Etiquetar as lâminas e colocar na incubadora com toalhetes húmidos para não secarem.
4. Inverter o frasco conta-gotas e apertar para aplicar 1 gota (cerca de 50 µl) de Controlo negativo no poço #1. Coloque 1 gota de Controlo Positivo no poço #2. Não encher demais.
5. Com uma micropipeta ou pipeta Pasteur, colocar 1 gota do soro diluído do paciente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demais os poços.
6. Colocar a tampa na incubadora e incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Retirar a lâmina da incubadora. Segurar pela extremidade e lavar com 10 ml de PBS com uma pipeta, ou lavar com recipiente cheio de PBS. Não usar a garrafa de lavagem. Colocar a lâmina no recipiente Coplin e lavar 10 minutos. Repetir a operação para todas as lâminas.
8. Retirar a lâmina do recipiente Coplin. Limpar as extremidades da lâmina num toalhete para retirar o excesso do PBS. Colocar a lâmina na incubadora. Inverter imediatamente o frasco conta-gotas do Conjugado e deitar 1 gota (cerca de 50 µl) em cada poço.
9. Repetir passos 7 e 8 para cada lâmina.
10. Colocar a tampa da incubadora. Incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
11. Retirar uma lâmina da incubadora. Segurar na lâmina e mergulhá-la num recipiente com PBS para remover o excesso de conjugado. Colocar a lâmina num disco de coloração com PBS durante 10 minutos. Pode colocar 2-3 gotas de contracorante azul de Evans à lavagem final. NOTA: Uma lavagem deficiente pode alterar a morfologia dos neutrófilos e levar a um aumento da fluorescência.
12. Retirar a lâmina do prato de coloração. Limpar o excesso de PBS. Para evitar que a lâmina seque deve passar para o ponto 13 enquanto a lâmina ainda está molhada.
13. Colocar a tampa e aplicar 3 gota de Meio de Suporte uniformemente em tampas e colocar a tampa. Não faça muita pressão e evite deslizamento lateral da tampa.
14. Repetir passos 12 e 13
15. Examinar a fluorescência específica com microscópis fluorescente com aumento de 200x ou mais.

As lâminas devem ser lidas quando estão prontas. Contudo, devido à presença de um agente anti-desaparecimento no meio de suporte, não há perdas significativas de intensidade de coloração, se a leitura for adiada até 48 horas. As lâminas devem ser guardadas às escuras a 2-8°C.

B. Determinação (titulação)

Um soro positivo na despistagem pode ser ainda mais testado com os passos 5 ao 13. Para determinar a titulação. Cada teste deve incluir os Controlos Positivo e Negativo. Fazer duas diluições começando com 1:2,5. O recíproco da diluição mais elevada a produzir uma reacção positiva é a titulação.

Preparação de diluições em série

Numerar 4 tubos de 1 a 4. Juntar 0,3 ml de diluente ao tubo 1 e 0,2 ml aos tubos 2 a 4. Pipetar 0,2 ml de soro não diluído para o tubo 1 e mexer bem. Transferir 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e mexer bem. Continuar a transferir 0,2 ml de um tubo para o outro após mexer.

Tubos	1	2	3	4
Soro	0,2 ml			
	+			
Diluente tamponado	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		⇌	⇌	⇌
Transferência		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluição final	1:2,5	1:5	1:10	1:20 etc.

CONTROLO DA QUALIDADE

O Controlo Positivo e o Negativo devem ser incluídos em cada teste. O Controlo Negativo não deve ter fluorescência específica do forro endomysial dos pacotes lisos do músculo, enquanto que o Controlo Positivo deve ter 2+ ou maior intensidade de coloração do tubos destas estruturas.

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

- Tubos. Usar outro controlo.
- Problemas no sistema óptico do microscópio de fluorescência: alinhamento incorrecto, lâmpada a precisar de ser mudada, etc.
- Lâmina seca durante o processo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos testes EMA devem ser negativos (<2,5), positivos com titulação e padrão. Lido para manchar específico do forro do endomysium do músculo liso empacota. **Ver A Foto 1.** EMA reagem como uma rede de linhas finas, irregulares em torno do sarcolemma dos fibrils lisos individuais do músculo. Isto está em um contraste afiado a ASMA que reagem com o sarcoplasm. **Ver A Foto 2.**

Outros anticorpos detectáveis além de ASMA incluem ANA. A presença de ASMA é sabida para causar resultados negativos falsos para EMA. Se ASMA forem detectados, a seguir a amostra deve ser testada em umas diluições mais elevadas. As reações de ANA no tecido liso do músculo, quando ocorrem, são geralmente fracas e distribuídas escassa e, conseqüentemente, improvável causar resultados negativos falsos.

Consultar Photo 1 e Photo 2 na extremidade deste original para reações do exemplo.

LIMITAÇÕES DO MODO OPERATÓRIO

Em alguns casos, o soro positivo para EMA pode ser muito fraco ou negativo na diluição inicial da despistagem (fenómeno prozona). Em casos tão duvidosos, o soro deve ser despistado com diluições mais elevadas e, se positivo, a titulação dos anticorpos deve ser determinada.

Em certos casos a presença de dois ou mais anticorpos no soro que são reactivos com o mesmo substrato, podem causar interferência na detecção por imunofluorescência. A interferência pode causar erro na detecção de EMA ou supressão do seu título, se o anticorpos tiver um título mais elevado que o EMA. A causa mais comum do fenómeno de interferência nos testes EMA é a co-existência de ASMA.

Recomenda-se que os soro dos pacientes que contém também ASMA estejam testados mais mais em umas diluições mais elevadas. IgA - ASMA não são uma ocorrência comum. IgG - ASMA não obstruem IgA-EMA como o anterior reagem com o sarcoplasm de pacotes lisos do músculo e o últimos reagem com o endomysium do sarcolemma em torno dos pacotes lisos do músculo. Os anticorpos de anti-reticulina não interferem com a reação de EMA porque não reagem com o tecido liso do músculo do primata. O presença de IgG - EMA pode interferir com a detecção de IgA - EMA. Entretanto, isto ocorre raramente como:

1. IgG - EMA estão atuais em somente 25% de pacientes da CD,
2. IgG - os titers de EMA são geralmente muito mais baixos do que titers de IgA-EMA e
3. Os anticorpos de IgA são geralmente de um ligar mais elevado do que anticorpos de IgG. Em alguns pacientes com CD e deficiência de IgA, os EMA-IgA são ausentes. Entretanto, tais pacientes são geralmente positivos para IgG - EMA.

Os pacientes com CD em uma dieta livre do gluten por > 9 meses são invariável negativos para EMA.

Ao fazer um diagnóstico, os resultados de todo o testar de laboratório devem sempre ser avaliados junto com o history clínico total do paciente.

VALORES ESPERADOS

Como visto em Table 1, EMA, como detectados no músculo liso do primata são marcadores altamente específicos para CD e DH. A presença de EMA parece ser relacionada ao patologia intestinal em CD e DH melhor que aos lesions de pele no último, como descrita em Figure 1 na extremidade deste original.

CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE ESPECÍFICA

O ImmuGlo EMA Test, usando a carcaça lisa do músculo do primata e um conjugado polivalente, foi comparado com um outro jogo comercialmente disponível que usa também um <<esophagus>> polivalente do conjugado e do macaco como uma carcaça. A comparação incluiu um total de 68 soro: 20 dos pacientes com CD clinica suspeitada e 48 dos controles normais. Os soro foram testados de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante. Uma diluição da seleção de 2.5 foi usada e todos os soro positivos para EMA-endpoint. Os resultados eram como segue:

		IMMCO EMA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other/Autre/Otro	POS (+)	18	0	18
Andere/Altro/Otra	NEG (-)	2	48	50
EMA IFA	TOT (=)	20	48	68

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/ relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa:	97%
relative sensitivity/sensibilitè relative/sensibilidad relativa/ relative Sensitivität/sensibilità relativa/sensibilidade relativa:	100%
relative agreement/concordance/concordancia relativa/ relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo:	96%

REFERENCES • REFERENCIAS • LITERATUR • RIFERIMENTI

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. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons New York; 1987, 3rd Ed, 3-40.
15. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1993 (HHS Pub. No. {CDC} 93-8395).

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

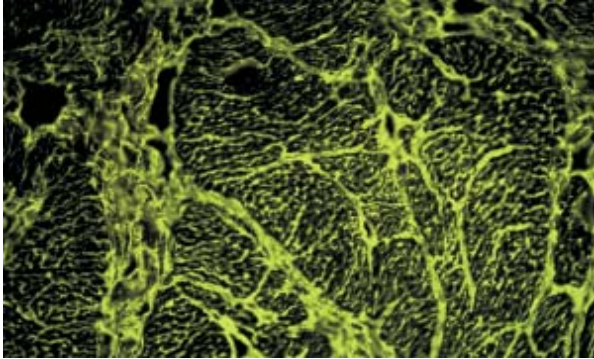


Photo 2. ASMA staining reaction on primate smooth muscle, 200X. Note staining of the smooth muscle sarcoplasm.

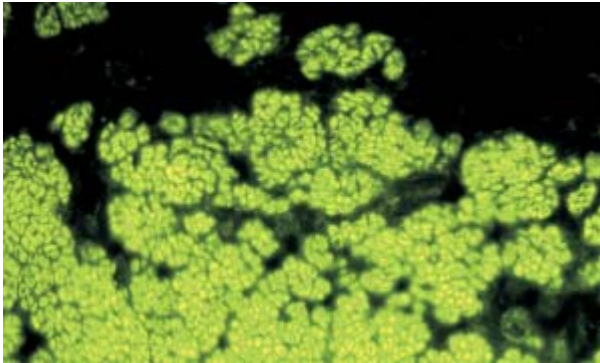
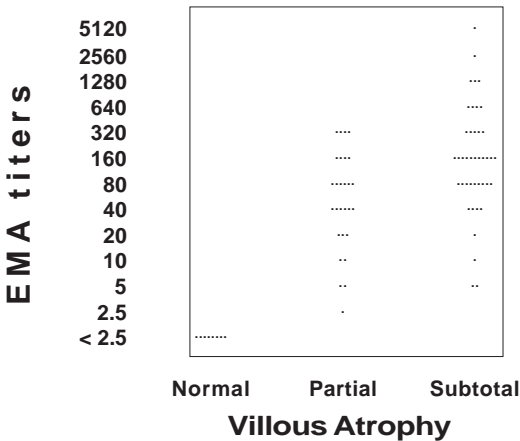


Figure 1: Correlation of IgA-EMA titers in Villous Atrophy



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 Dermatitis	4	0
Other Skin Diseases	180	0

Compiled from the literature as per Chorzelski TP et al¹.



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
 Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé
 EMERGO Group, Inc.
 Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
 The Netherlands
 Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
 www.emergogroup.com

For technical assistance please contact:



IMMCO
DIAGNOSTICS

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

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

E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor