



ANTI-SKIN ANTIBODIES (ASA)



CODE 44560 48 Tests	CODE 44561 12 x
BEI 2-8 °C AUFBEWAHREN	
Reagenzien zur qualitativen Antikörperbestimmung von Anti-Haut <i>In-vitro</i> -Diagnostikum für das klinische Labor	

ANTI-HAUT-ANTIKÖRPER (ASA)

Indirekte Immunfluoreszenz
PRIMATENÖSOPHAGUS

METHODENPRINZIP

Anti-Haut-Antikörper (ASA) im Serum binden an die entsprechenden Antigene im Gewebeschnitt des Primatenösophagus. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden mittels Fluorescein-markierten Antikörpern gegen humanes Immunglobulin G nach Inkubation nachgewiesen und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht.¹

INHALT

CODE 44560	
A. Objektträger	12 x 4 Felder
B. PBS-10x	1 x 100 mL
C-. Kontrolle negativ	1 x 0,3 mL
D. IgG FITC/Evans (M)	1 x 3,5 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL
F. Blotting-Papier	1 x 12

CODE 44561	
A. Objektträger	12 x 4 Felder

ZUSAMMENSETZUNG

- A. **Objektträger.** Gewebeschnitte des Primatenösophagus.
- B. **PBS (10x):** Natriumphosphat 112,5 mmol/L, Kaliumphosphat 30 mmol/L, Natriumchlorid 1,15 mol/L, Natriumazid 0,95 g/L, pH-Wert 7,2.
- C-. **Kontrolle negativ:** Humanserum, Natriumazid 0,95 g/L.
- D. **IgG FITC/Evans (M):** Gegen humanes Immunglobulin G gerichtete Antikörper, konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und absorbiert mit Affeserum, Evans-Blau 0,01 g/L, Natriumazid 0,95 g/L.
- E. **Mounting Medium.** Eindeckmedium: Mowiol 12%, Glycerol 30%, Tris 20 mmol/L, sodium azide 0,95 g/L.
- F. **Blotting-Papier.**

Die für die Herstellung der positiven und negativen Kontrollen verwendeten Humanseren wurden getestet und in Bezug auf die Anwesenheit von Anti-HIV- und Anti-HCV-Antikörpern sowie von HBs-Antigen für negativ befunden. Dennoch sollten die Kontrollen mit Vorsicht und als potentiell infektiös behandelt werden.

LAGERUNG

Bei 2-8°C aufbewahren.

Die Reagenzien bleiben bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil, sofern sie fest verschlossen gelagert werden und eine Kontamination während ihrer Anwendung vermieden wird.

Anzeichen für Verfall:

- Flüssige Bestandteile: Vorhandensein von Partikeln, Trübung.
- Objektträger: Eingerissene Folienpackung, makroskopisch sichtbare Defekte am Gewebeschnitt, wie Kratzer oder eine sich ablösende Zellschicht.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN

- B. **PBS (10x).**
- D. **IgG FITC/Evans (M).**
- E. **Mounting Medium.** Eindeckmedium.
- C+. **ASA-is-Kontrolle positiv.** Humanserum mit anti-Haut-Antikörpern, die gegen die interzelluläre Substanz gerichtet sind, Natriumazid 0,95 g/L.
- C+. **ASA-bm-Kontrolle positiv.** Humanserum mit anti-Haut-Antikörpern, die gegen die Basalmembran gerichtet sind, Natriumazid 0,95 g/L.
- C-. **Kontrolle negativ.**

REAGENZIENVORBEREITUNG

PBS: Verdünnen Sie Reagenz B im Verhältnis von 1:10 mit destilliertem Wasser. Bei 2-8°C bleibt es eine Woche stabil.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE AUSRÜSTUNG

- Feuchte Kammer
- Waschküvette
- Deckgläser 24 x 60 mm
- Fluoreszenzmikroskop mit einem Anregungsfilter von 495 nm und einem Emissionsfilter von 525 nm zum Sichtbarmachen der FITC-Markierung.

PROBEN

Mit gebräuchlichen Verfahren gewonnenes Serum oder Plasma. Bei 2-8°C bleibt es eine Woche stabil.

Verdünnen Sie die Proben vor dem Test im Verhältnis von 1:10 mit PBS (siehe Reagenzienvorbereitung).

Zur Titration positiver Proben verdünnen Sie diese in einer Verdünnungsreihe jeweils zweifach, beginnend mit einem Verhältnis von 1:10 mit PBS.

VERFAHREN

1. Bringen Sie die Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur.
2. Geben Sie auf jedes Feld des Objektträgers einen Tropfen (50 µL) der verdünnten Probe oder der Kontrolle. Achten Sie darauf, dass das Feld vollständig bedeckt ist (Anmerkung 1).
3. Inkubieren Sie den Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur (15-30°C) in der feuchten Kammer.
4. Zum Entfernen von Probentropfen klopfen Sie vorsichtig gegen den geeigneten Objektträger. Vermeiden Sie dabei eine Kreuzkontamination der Seren.
5. Spülen Sie den Objektträger vorsichtig mit PBS ab (siehe Reagenzienvorbereitung sowie Anmerkung 2).

6. Waschen Sie den Objektträger 5 Minuten lang gründlich in einer mit PBS gefüllten Waschküvette. Wechseln Sie das PBS und wiederholen Sie das Waschen.
7. Tupfen Sie die Objektträger zum Entfernen der Flüssigkeit vorsichtig mit dem mitgelieferten Blotting-Papier ab. Die Gewebeschnitte müssen jedoch während des Verfahrens feucht gehalten werden.
8. Geben Sie auf jedes Feld einen Tropfen Reagenz D. Inkubieren Sie den Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur (15-30°C) in der feuchten Kammer.
9. Wiederholen Sie die Schritte Waschen (6) und Abtupfen (7).
10. Geben Sie auf jedes Feld einige Tropfen Reagenz E und decken Sie den Objektträger mit einem Deckglas ab, ohne dabei Luftblasen einzuschließen.

AUSWERTUNG

Werten Sie den Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop (250-400x) aus. Die besten Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn die Auswertung der Objektträger sofort erfolgt. Wählen Sie dazu mittig gelegene Ausschnitte des Gewebeschnitts, da die Fluoreszenzintensität an dessen Rand für die Präparation nicht repräsentativ ist.

Tritt in der empfohlenen Verdünnung die nachfolgend beschriebene spezifische Fluoreszenzfärbung auf, gilt dies als positives Ergebnis.

Gegen die interzelluläre Substanz gerichtete ASA: Fluoreszenzfärbung des Interzellulärraums im Epithelgewebe.

Gegen die Basalmembran gerichtete ASA: Lineare Fluoreszenz der epithelialen Basalmembran.

Positive Seren können austitriert werden.

Wenn keine der spezifischen Färbungen zu erkennen sind, sollte das Ergebnis als negativ für diese Antikörper angesehen werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Positivkontrollen (C+1 und C+2)) sowie die Negativkontrolle (C-) müssen gleichzeitig mit den vom Patienten entnommenen Proben ausgeführt werden, um die Funktionsfähigkeit des Untersuchungsverfahrens nachzuweisen.

Die Kontrollen positiv (C+) sollten die oben beschriebene spezifische Färbung ergeben.

Die Kontrolle negativ (C-) darf keine spezifische Färbung ergeben.

Jedes Labor sollte ein internes Protokoll für die Qualitätskontrolle sowie Maßnahmen zur Fehlerbehebung für den Fall festlegen, dass die Kontrollergebnisse nicht innerhalb der zulässigen Toleranzgrenzen liegen.

TESTEIGENSCHAFTEN

- Das Konjugat IgG FITC/Evans (M) ist in Bezug auf den internationalen WHO-Referenzstandard für FITC-markierte Ig-Antihuman-Antikörper (Schaf) kalibriert.
- Die gegen die interzelluläre Substanz gerichteten ASA reagieren mit Desmoglein 3, einem Bestandteil der epidermalen Desmosome. Dabei handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, das zur Cadherin-Familie gehört.
- Die gegen die Basalmembran gerichteten Antikörper reagieren mit den Antigenen, die zwischen der Lamina densa und dem Hemidesmosom vorkommen, das sich im dermalen Ende der basalen Keratinozyten befindet.

DIAGNOSTISCHE EIGENSCHAFTEN

Gegen den Interzellulärraum der geschichteten squamösen Epithelien gerichtete anti-Haut-Antikörper sind für Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus und paraneoplastischen Pemphigus charakteristisch. Die mittels indirekter Immunfluoreszenz gewonnenen Ergebnisse sind zwar hochspezifisch für Pemphigus, gestatten jedoch keine Differenzierung des Pemphigus-Typs. Bei einem geringen Teil der Pemphigus-Patienten können keine zirkulierenden Antikörper nachgewiesen werden, da sie bereits an die Haut des Patienten gebunden sind.²

Gegen die Basalmembran gerichtete Antikörper lassen sich mittels indirekter Immunfluoreszenz bei 70% der Patienten mit bullösem Pemphigoid, bei 20-25% der Patienten mit Herpes gestationis und bei 10% der Patienten mit Cicatricial Pemphigoid nachweisen.³

Der Testkit Anti-Haut-Antikörper von BioSystems wurde mit 91 Seren von Patienten mit bullösen Erkrankungen sowie von gesunden Spendern überprüft. Die Ergebnisse sind im folgenden beschrieben.

Gruppen	n	ASA-is	ASA-bm
Patienten mit Pemphigus vulgaris	23	18	0
Patienten mit bullösem Pemphigoid	18	0	16
Kontrollgruppe Gesunde	50	0	0

Die BioSystems ASA-Bestimmungen besitzen eine Sensitivität von 78% bei Pemphigus vulgaris und von 89% bei bullösem Pemphigoid sowie eine Spezifität von 100% für beide Erkrankungen.

Die klinische Diagnose sollte nicht nur anhand eines einzigen Testergebnisses, sondern der Gesamtheit der klinischen Befunde und Laborergebnisse gestellt werden.

ANMERKUNGEN

1. Vermeiden Sie es, die auf den Feldern fixierten Gewebeschnitte während der Durchführung des Verfahrens zu berühren.
2. Um beim Waschen der Objektträger eine Kreuzkontamination zwischen benachbarten Proben zu vermeiden, empfiehlt sich die Verwendung einer Spritzflasche oder Pipette.

LITERATUR

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. In: Methods in Nonradioactive Detection. Hrsg. Howard GC. Appleton & Lange, 1993.
2. Mascaró JM, Fairley JA, Giudice GJ, Díaz LA. Autoantibodies in pemphigus vulgaris. In: Autoantibodies. Hrsg. James B. Peter und Yehuda Schoenfeld. Elsevier, 1996.
3. Giudice GJ, Díaz LA. Autoantibodies in bullous pemphigoid, herpes gestationis and cicatricial pemphigoid. In: Autoantibodies. Hrsg. James B. Peter und Yehuda Schoenfeld. Elsevier, 1996.