



CODE 44148 16 Bestimmungen	CODE 44548 48 Bestimmungen	CODE 44715 96 Bestimmungen
CODE 44557 12 x 	CODE 44710 12 x 	
BEI 2-8°C AUFBEWAHREN		
Reagenzien zur qualitativen Antikörperbestimmung von Anti-Endomysium <i>In-vitro</i> -Diagnostikum für das klinische Labor		

## ANTI-ENDOMYSIUM ANTIBODIES (AEA)



## ANTI-ENDOMYSIUM-ANTIKÖRPER (AEA)

AFFEN-ÖSOPHAGUS (ENDOMYSIUM)

### METHODENPRINZIP

Anti-Endomysium-Antikörper (AEA) im Serum binden an die entsprechenden Antigene im Gewebeschnitt des unteren Drittels des Affen-Ösophagus. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden mittels Fluorescein-markierten Antikörpern gegen humanes Immunglobulin A nachgewiesen und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht.<sup>1</sup>

### INHALT

	CODE 44148	CODE 44548	CODE 44715
A. Objektträger	4 x 4 Felder	12 x 4 Felder	12 x 8 Felder
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. AEA-Kontrolle positiv	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
C-. Kontrolle negativ	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
D. IgA FITC/Evans	1 x 3,5 mL	1 x 3,5 mL	2 x 3,5 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Blotting-Papier	1 x 4	1 x 12	1 x 12

	CODE 44557	CODE 44710
A. Objektträger	12 x 4 Felder	12 x 8 Felder

### ZUSAMMENSETZUNG

- A. Objektträger: Jedes Feld enthält einen Gewebeschnitt des Affen-Ösophagus (Endomysiums).
- 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+. AEA-Kontrolle positiv: Humanserum mit Anti-Endomysium-Antikörpern (AEA), Natriumazid 0,95 g/L.
- C-. Kontrolle negativ: Humanserum, Natriumazid 0,95 g/L.
- D. IgA FITC/Evans: Gegen humanes IgA gerichtete Antikörper (Ziege), konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), 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 Kontrollen positiv und negativ verwendeten Humansenen 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

- Für Code 44148, 44548 und 44715 werden keine zusätzlichen Reagenzien benötigt.
- Für Code 44557 und 44710 werden zusätzlich die folgenden einzelnen erhältlichen Reagenzien benötigt:
  - B. PBS (10x).
  - D. IgA FITC/Evans-markiert, Gegenfärbung mit Evans-Blau.
  - D. IgG FITC/Evans (M).
  - E. Mounting Medium. Eindeckmedium.
  - C+. AEA-Kontrolle positiv.
  - 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 AUSTRÜSTUNG

- 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 1:5 mit PBS (siehe Reagenzienvorbereitung).

Zur Titration positiver Proben verdünnen Sie diese in einer Verdünnungsreihe jeweils zweifach, beginnend mit einem Verhältnis von 1:5 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 (siehe Reagenzienvorbereitung) ab (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 einen mittig gelegenen Ausschnitt des Gewebeschnitts, da die Fluoreszenzintensität an dessen Rand für die Präparation nicht repräsentativ ist.

Alle Seren, die in der empfohlenen Verdünnung eine netzartige Fluoreszenzmarkierung der Membran zeigen, von der die Muskelfasern der glatten Muskulatur des Affen-Ösophagus umgeben sind, gelten als positiv.

Positive Seren können auswertet werden. Der Serumtiter ist definiert als die letzte Verdünnungsstufe, bei der noch ein positives Ergebnis festgestellt wird.

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

### QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Überprüfung der Assay-Leistung sollte die in den Testkits Code 44148, Code 44548 und Code 44715 enthaltene Kontrolle positiv (C+) und Kontrolle negativ (C-) zusammen mit den Patientenproben getestet werden.

Die Kontrolle positiv (C+) sollte 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

Der IgA FITC/Evans Konjugat ist gegen Internationalen Muster der WHO von menschlichen Anti-immunglobulin von Schaf kalibriert und mit FITC-Konjugiert. Das Konjugat IgA FITC/Evans (M) ist gegenüber dem Normal der WGO mit FITC-markierten Human Anti-immunglobulinen IgG vom Schaf kalibriert.

Die Spezifität der AEA-Kontrolle positiv wurde mit einem internen Referenz-Humanserum überprüft.

### DIAGNOSTISCHE EIGENSCHAFTEN

Anti-Endomysium-Antikörper (AEA) der IgA-Klasse kommen bei Patienten mit aktiver Zöliakie oder Dermatitis herpetiformis vor. Die diagnostische Sensitivität für Zöliakie beträgt beim unbehandelten Patienten 68-100% und die diagnostische Spezifität liegt bei 99-100%, woraus sich ein hoher positiver und negativer Vorhersagewert ergibt.<sup>2,3</sup>

Die IgA-AEA-Sensitivität für Dermatitis herpetiformis beträgt 70-80%. Geht die Erkrankung jedoch mit Gluten-sensitiver Enteropathie einher, sind es 100%.<sup>4</sup> Im Falle von Zöliakie-Patienten mit angeborener IgA-Defizienz können spezifische Antikörper unter Verwendung des Konjugats IgG FITC/Evans (M) detektiert werden.

Der Testkit Anti-Endomysium-Antikörper von BioSystems wurde mit 125 Seren von Patienten mit verschiedenen Autoimmunkrankheiten und gesunden Spendern überprüft. Die Ergebnisse sind im folgenden beschrieben.

n	Patienten	IgA		IgG	
		Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
50	Zöliakie	50	0		
20	Sonstige Autoimmun-Krankheiten	0	20		
5	Zöliakie mit IgA-Defizit	0	5	2	3
50	Kontrolle gesunde Personen	0	50	0	50

Die klinische Diagnose sollte nicht nur anhand eines einzigen Testergebnisses, sondern der Gesamtheit der klinischen Befunde und Laboregebnisse 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. Kapuscinska A et al. Disease specificity and dynamics of changes in IgA class anti-endomysial antibodies in celiac disease. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 1987; 6:529-534.
3. Scott H und Brandtzaeg P. Endomysial autoantibodies. In: Autoantibodies. Hrsg. James B. Peter und Yehuda Schoenfeld. Elsevier, 1996.
4. Hälstrom O. Comparison of IgA-class reticulon and endomysium antibodies in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. Gut 1989; 30:1225-1232.