

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung AAK gegen Endomysium Immunfluoreszenz	Dokument: SA-SE-EIGA Version: D Seite: 1/5
--	--	--

Änderungshinweis	<ul style="list-style-type: none"> - Testdurchführung – geänderte Mengen - Durchführung der Qualitätskontrollen - Literaturangaben
------------------	---

Inhaltsverzeichnis

1.	Zweck.....	2
1.1.	Analyt.....	2
1.2.	Indikation.....	2
2.	Prinzip des Analysenverfahrens.....	2
3.	Untersuchungsmaterial	2
4.	Benötigte Geräte, Hilfsmittel und Materialien	2
4.1.	Geräte	2
4.2.	Hilfsmittel	2
4.3.	Materialien	3
5.	Durchführung	3
5.1.	Probenvorbereitung.....	3
5.2.	Kalibrierung.....	3
5.3.	Testablauf	4
5.4.	Berechnung.....	4
6.	Qualitätskontrolle	4
6.1.	Durchführung der Kontrollen	4
6.2.	Freigabe der Ergebnisse	4
7.	Beurteilung und Grenzen des Verfahrens	4
7.1.	Angabe von Präzision und Richtigkeit.....	4
7.2.	Angabe von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze	5
7.3.	Angabe von Linearität und Spezifikation	5
7.4.	Angaben zur Methodvalidierung	5
8.	Ergebnisse und Befundbericht	5
8.1.	Auswertung und Angabe des Ergebnisses	5
8.2.	Referenzbereich.....	5
9.	Hinweise und Störungen	5
10.	Referenzen	5
11.	Anlage.....	5

	erstellt	geprüft	freigegeben
Datum	24.04.12	25.04.12	26.04.12
Unterschrift			
Name	S. Arnoldt	E. Etzold	S. Arnoldt
Abteilung	QMB	Infektionsserologie	QMB

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung AAK gegen Endomysium Immunfluoreszenz	Dokument: SA-SE-EIGA Version: D Seite: 2/5
--	--	--

1. Zweck

1.1. Analyt

- Autoantikörper gegen Endomysium (IgG + IgA) EIGA

1.2. Indikation

- Gluten-sensitive Enteropathie
- Dermatitis herpetiformis Duhring

Man sollte Endomysium-Antikörper der Klassen IgG und IgA parallel untersuchen, da ein IgA-Mangel bei oben genannten Patientengruppen vorliegen kann.

2. Prinzip des Analysenverfahrens

Indirekte Immunfluoreszenz.

Gefrierschnitte des Primatendarms werden mit verdünnten Patientenproben inkubiert. Bei positiven Proben binden sich die spezifischen Antikörper an die Antigene. Die gebundenen Antikörper werden mit Fluorescein-markierten Anti-human-Antikörpern angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

3. Untersuchungsmaterial

Probenmaterial:	Serum, Plasma	
	Stabilität, Lagerbedingungen:	bei +2°C bis +8°C bis 14Tage
Mindestmenge:	50 µl	
Ausschlusskriterien:	entfällt.	

4. Benötigte Geräte, Hilfsmittel und Materialien

4.1. Geräte

- Fluoreszenzmikroskop mit Bluelight PM-SE-354

4.2. Hilfsmittel

- Eppendorfpipetten
- Pipettenspitzen
- Multipipette
- Messkolben
- Rack für Eppendorfhütchen
- Aqua dest. (entionisiertes Wasser)

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung AAK gegen Endomysium Immunfluoreszenz	Dokument: SA-SE-EIGA Version: D Seite: 3/5
--	--	--

- Eppendorfhütchen
- Reagenzträger
- Waschküvetten
- Kleenex
- Tablett
- Wecker
- Deckgläser

4.3. Materialien

Reagenzien (Fa. EUROIMMUN)

- Objektträger, bestückt mit BIOCHIP`s, die mit Gefrierschnitten des Primatendarms beschichtet sind
- Fluorescein-markiertes Anti-Human-IgG u. IgA (gebrauchsfertig)
- positives und negatives Kontrollserum (gebrauchsfertig)
- Salz für Phosphatpuffer pH 7,2
- Tween 20
- Eindeckmedium

Haltbarkeit nach Rekonstitution bzw. Öffnen

- Objektträger (verschlossen) auf Raumtemperatur bringen → nach Öffnen der Schutzhülle innerhalb von 15 min inkubieren
- Fluorescein-markiertes Anti-Human-IgG + IgA bei +2-8°C bis zum Verfallsdatum
- PBS-Tween bei +2-8°C 1 Woche haltbar
- positives und negatives Kontrollserum bei +2-8°C bis zum Verfallsdatum
- Eindeckmedium bei +2-8°C bis zum Verfallsdatum
- Objektträger (ungeöffnet) bei -20 - +8°C bis zum Verfallsdatum

Herstellung

PBS -Tween: 1 Packung Salz für Phosphatpuffer pH 7,2 in 1 Liter Aqua dest auflösen
+ 2 ml Tween 20 dazu

5. Durchführung

5.1. Probenvorbereitung

Serum-, Plasmaverdünnung: 1:10

5.2. Kalibrierung

entfällt.

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung AAK gegen Endomysium Immunfluoreszenz	Dokument: SA-SE-EIGA Version: D Seite: 4/5
--	--	--

5.3. Testablauf

- **30 µl** verdünnte Proben (doppelt: für IgG u. IgA Bestimmung) und Kontrolle auf Reagenzträger pipettieren (Luftblasen vermeiden)
→ Objektträger in eine Aussparung des Reagenzträgers legen
- **30 min** bei Raumtemperatur inkubieren
- Objektträger mit PBS-Tween abspülen und **5 min** in eine Küvette mit PBS-Tween stellen
- **25 µl** markierter Antikörper IgG + IgA auf Reagenzträger pipettieren
- Objektträger auf den Reagenzträger legen
- **30 min** bei Raumtemperatur inkubieren
- Objektträger mit PBS-Tween abspülen und **5 min** in eine Küvette mit PBS-Tween stellen
- Objektträger aus Küvette nehmen → mit Papiertuch Rückseite und alle vier Kanten abtrocknen → 1 Tropfen Eindeckmedium auf Deckglas geben → danach Deckglas auf Objektträger legen

→ bei positiven Ergebnissen muss eine Titerreihe angeschlossen werden:



5.4. Berechnung

entfällt.

6. Qualitätskontrolle

6.1. Durchführung der Kontrollen

- gebrauchsfertige Positiv- und Negativ-Kontrolle der Fa. Euroimmun

Stabilität: - bei 2 - 8°C im Kühlschrank bis zum angegebenen Datum haltbar

Die beiden Kontrollen werden bei jedem Ansatz mitgeführt. Die Dokumentation erfolgt in der Labor-EDV.

6.2. Freigabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden manuell in die Labor – EDV eingegeben, die Befundung auffälliger Ergebnisse erfolgt durch einen Laborarzt.

7. Beurteilung und Grenzen des Verfahrens

7.1. Angabe von Präzision und Richtigkeit

siehe Packungsbeilage „Testcharakteristika“

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung AAK gegen Endomysium Immunfluoreszenz	Dokument: SA-SE-EIGA Version: D Seite: 5/5
--	--	--

7.2. Angabe von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Patientenverdünnung: 1:10 → Positiv - keine obere Bestimmungsgrenze durch die Möglichkeit der weiteren Probenverdünnung

7.3. Angabe von Linearität und Spezifikation

siehe Angaben der Packungsbeilage

7.4. Angaben zur Methodvalidierung

siehe Packungsbeilage „Testcharakteristika“

8. Ergebnisse und Befundbericht

8.1. Auswertung und Angabe des Ergebnisses

Auswertung erfolgt mikroskopisch.

Bei positivem Befund fluoresziert das Bindegewebe der Zotten und der Krypten.

Die Muskelschicht zeigt eine wabenartige Fluoreszenz.

Die Endothelien der Submucosa-Gefäße sind auch angefärbt.

Ein positiver Befund bedarf einer weiteren Abklärung → Titerreihe ansetzen

Als Endtiter wird diejenige Verdünnungsstufe angegeben, bei der eine spezifische Fluoreszenz gerade noch erkennbar ist.

Die Angabe des Ergebnisses erfolgt als Titerstufe

8.2. Referenzbereich

Negativ (< 1:10)

9. Hinweise und Störungen

- Objektträger lichtgeschützt aufbewahren
- Objektträger müssen verschlossen auf Raumtemperatur gebracht werden

10. Referenzen

L. Thomas „Labor und Diagnose“ 7. Auflage 2008 S.: 1191 ff.

Gressner, Arndt „Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik“ Band 1 2007

11. Anlage

Packungsbeilage
Fluoreszenzmuster