

Anti-Kératine (IF) - Coupes d'œsophage de rat

REF | ME 0131 | **Lame de substrat (4 puits)**

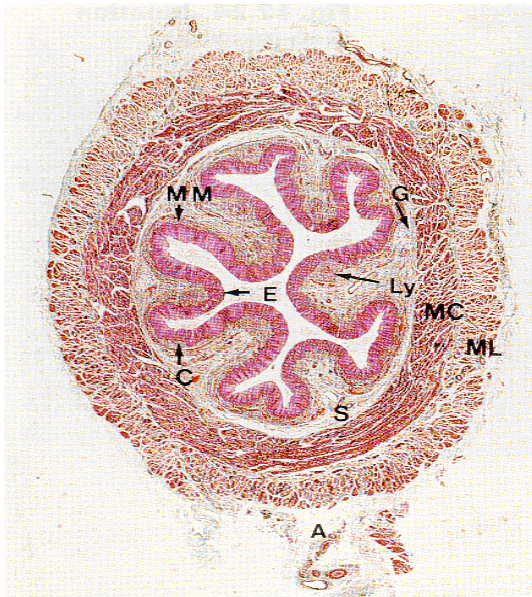
DÉFINITION

Les **coupes d'œsophage de rat (IF)** permettent le dépistage des anticorps anti-Kératine dans les sérums de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (RA) par une technique d'immunofluorescence indirecte.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

La polyarthrite rhumatoïde est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Les anticorps anti-kératine sont un marqueur spécifique de la polyarthrite rhumatoïde. Ils sont présents dans 50 % des polyarthrites séropositives et 20 % des formes séronégatives, mais ne sont pas retrouvés dans les autres rhumatismes inflammatoires.

Ces anticorps se fixent sur l'épithélium pavimenteux stratifié kératinisé qui borde la lumière du tiers inférieur de l'œsophage.



Cette section effectuée au niveau du tiers inférieur de l'œsophage montre les couches de base du tractus gastro-intestinal. La lumière de l'œsophage est bordée par un épithélium pavimenteux stratifié épais de protection **E** qui, chez certains animaux, tels les rongeurs, peut être kératinisé. Le chorion sous-jacent **C** contient des îlots lymphoïdes **Ly**. La musculature muqueuse **MM** est à peine visible à ce grossissement. La sous-muqueuse **S** contient quelques glandes muqueuses **G** qui ne s'observent essentiellement qu'au niveau du tiers inférieur de l'œsophage. Dans la musculature, la couche circulaire interne **MC** et la couche externe longitudinale **ML** de muscle lisse sont nettement visibles. Puisque la première partie de la déglutition est sous contrôle volontaire, les faisceaux de muscle strié prédominent dans la musculature du tiers supérieur de l'œsophage. En dehors de la musculature, l'adventice **A**, très richement vascularisée se continue avec le tissu conjonctif adjacent. Au repos, la muqueuse œsophagienne présente des replis profonds ; cette disposition permet une distension importante lors du passage du bol alimentaire.

PRINCIPE DU TEST

Les anticorps anti-kératines sont détectés par immunofluorescence indirecte sur des coupes d'œsophage de rat (effectuée dans le tiers inférieur kératinisée) avec un conjugué fluorescent.

Étape N°1 :

Des coupes d'œsophage de rat immobilisées sur des lames sont recouvertes de sérum de patient dilué et incubées pour permettre la fixation des anticorps anti-kératine présents dans le sérum.

Étape N°2 :

Les sites de réactivité ayant fixé les anticorps anti-kératine sont révélés par un conjugué anti-humain IgG marqué à la fluorescéine

Une réaction est identifiée comme positive en immunofluorescence si on peut mettre en évidence un marquage vert pomme typique et caractéristique de chaque auto-anticorps.

COMPOSITION DU COFFRET

		ME 0131
Lame de substrat (Esophage de rat) (Coupes d'œsophage de rat sur des lames à puits multiples)		1 lame de 4 puits
SORB SLD 4		
Buvard pour essuyer autour des puits		1

RÉACTIFS DISPONIBLES INDIVIDUELLEMENT

ME 902.2	Conjugué fluorescent anti-IgG (2 ml)
ME 902.8	Conjugué fluorescent anti-IgG (8 ml)
IMM 2245	Contrôle positif anti-filagrine (0,5 ml)
HME NEG	Contrôle négatif (500 µl)
HME MM	Milieu de Montage Glycérol (3,5ml)
HME PBS10	Sachet de PBS en poudre 10g (10x1l)
HME 12CS	Lamelles de verre 24x60mm (100 unités)

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Pipette de précision 10-15 µl
- Tubes à hémolyse et portoir ou microplaques à fond en U
- Chambre humide telle qu'une boîte de pétri contenant du papier filtre humide
- Bacs à coloration avec porte-lames
- Flacon de 1l ou éprouvette graduée
- Becher pour le PBS
- Lamelles de verre de 24x60 mm
- Eau distillée
- Microscope à fluorescence
- Chronomètre
- Pinces

- Recueillir les échantillons de sang dans des tubes secs.
- Le sérum doit être séparé du caillot aussi rapidement que possible de façon à éviter l'hémolyse.
- Les échantillons seront conservés au maximum 48 heures à +2°C-+8°C. Pour des conservations prolongées, ils seront congelés à -20°C.
- Des sérums troubles, hémolysés, contaminés ou de patients traités peuvent altérer les performances du test. Ne pas utiliser de sérums hémolysés ou lipémiques.
- Manipuler les échantillons sériques humains comme s'ils étaient potentiellement infectieux.

STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Les dates de péremption des lames sont établies pour une conservation à -20°C ou en dessous.

Nous recommandons d'utiliser avec ce substrat les réactifs cités précédemment dans le § « REACTIFS DISPONIBLES INDIVIDUELLEMENT ».

- *Après décongélation, le conjugué reste stable pendant 90 jours s'il est conservé entre +2°C et +8°C. Ne pas aliquoter le conjugué à -20°C.*
- *Les cycles répétés de congélation-décongélation sont dommageables pour les produits et doivent être évités.*
- *Le milieu de montage conservé au réfrigérateur, est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée.*
- *Le PBS en poudre peut être conservé à température ambiante jusqu'à sa date de péremption.*

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Les réactifs **bmd** sont uniquement destinés à une utilisation diagnostique *in vitro*.

Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.

Ramener tous les réactifs à température ambiante pendant 15 min avant la fin de la première incubation.

Après décongélation de la lame, la sortir de son emballage au moment du dépôt des sérums pour éviter tout dessèchement des puits.

Afin de ne pas altérer les coupes de tissus :

- Tout dépôt devra être appliqué sur le pourtour des puits de façon à ne pas toucher les coupes de tissus avec les embouts de pipettes.
- Ne pas rincer les lames à l'aide d'une pipette ou d'une pissette lors des lavages.
- N'appliquer aucune pression sur la lamelle lors du montage.
- Ne pas déplacer la lamelle après le montage.
- Ne pas utiliser de feutres ou marqueurs pour identifier les lames afin d'éviter d'éventuels aspects parasites.
- **Ne jamais pipeter à la bouche.**

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Avant la manipulation, laisser les lames revenir à température ambiante pendant 15 minutes.

1. Reconstitution du tampon PBS

- Dissoudre le PBS en poudre dans une bouteille d'eau distillée stérile (1 litre).
Laisser reposer 10 min avant utilisation.
- Durée de conservation : 4 semaines entre +2°C et +8°C.

2. Dilution des sérums

- Diluer les échantillons au **1/10** dans le tampon PBS. Pour les titrations, procéder à des dilutions de raison 2 : ex 1/20, 1/40 ...
- Agiter au vortex

1. Incubation des sérums

- Identifier les puits qui contiendront les contrôles positif, négatif et les dilutions sériques testées.
- Sortir la lame de son emballage et la placer dans la chambre humide.
- Déposer rapidement dans les puits respectifs :
 - **40 µl** d'échantillon dilué **en évitant de toucher le substrat avec l'embout de la pipette.**
 - 1 goutte de contrôle positif prêt à l'emploi,
 - 1 goutte de contrôle négatif prêt à l'emploi
- Renouveler l'opération pour la lame suivante.
- Laisser incubé 30 minutes à température ambiante.

Ne pas laisser sécher les puits des lames.

2. Lavage en tampon PBS

- Retirer les lames de la chambre humide.
 - Eliminer le sérum d'un geste sec au dessus d'une poubelle pour éviter les contaminations.
 - Immerger les lames plusieurs fois dans un bain de PBS frais. **Ne pas utiliser de bouteille de lavage pour rincer les lames.**
 - Placer immédiatement les lames dans un portoir à lames contenant un bain de PBS frais et laisser incubé 10 minutes à température ambiante. L'agitation n'est pas nécessaire
- N.B : Si plus de 10 lames sont manipulées en même temps, effectuer 2 bains de PBS de 5 minutes chacun.

⚠ Une incubation prolongée ou un lavage mal effectué peuvent affecter la morphologie du substrat et augmenter le bruit de fond fluorescent.

3. Incubation du Conjugué

- Retirer les lames une à une du portoir.
- Egoutter doucement la lame sur du papier absorbant.
- Sécher la lame brièvement à l'aide du buvard fourni et la remettre en chambre humide.
- Déposer immédiatement 1 goutte de conjugué dans chaque puits.
- S'assurer que tous les puits soient parfaitement recouverts.
- Laisser incubé 30 minutes à température ambiante à **l'abri de la lumière directe.**

Ne pas laisser sécher les puits des lames.

4. Rinçage en tampon PBS

- Répéter l'étape 2 « Lavage en tampon PBS »

5. Montage de la lamelle

- Déposer immédiatement 3 à 4 gouttes de milieu de montage entre les puits.
- Poser une extrémité de la lamelle sur la lame puis recouvrir celle-ci progressivement pour que le milieu de montage diffuse régulièrement. Ne pas exercer de pression ou de mouvements latéraux qui peuvent endommager les substrats.

6. Lecture

Il est recommandé de lire les lames le jour du test au microscope à fluorescence à l'aide d'un objectif x10 et d'utiliser les objectifs x25 et x40 pour confirmer une fluorescence identifiée.

N.B : En cas de lecture retardée, sceller les lames avec du vernis à ongle incolore et conserver les au réfrigérateur.

INTERPRÉTATION DES RESULTATS

Pour tout sérum positif au 1/10, réaliser un dosage par des dilutions successives de raison 2 (1/20, 1/40, 1/80 et 1/160).

Anticorps Recherchés	Titre significatif
Anticorps anti-Kératine	$\geq 1/10$

Réaction positive :

Une réaction est considérée positive si une fluorescence verte apparaît dans la couche cornée de l'épithélium d'œsophage de rat.

Tout résultat positif doit être contrôlé sur un second prélèvement 2 mois plus tard et toujours interprété en fonction du contexte biologique et clinique.

Réaction négative :

Un simple liseré fluorescent ne doit pas être considéré comme positif.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Si les résultats obtenus ne sont pas conformes, la série doit être recommencée. Quand des observations atypiques se confirment, il est alors recommandé de vérifier si :

- la quantité adéquate de sérum a été déposée sur les puits.
- les puits ne se sont pas asséchés durant les incubations de sérum et de conjugué.
- il n'y a pas de signe de contamination microbienne des réactifs liquides provoquée par une conservation ou une manipulation inappropriées. Si l'un des réactifs liquides apparaît trouble, il doit être jeté et remplacé par un autre flacon.
- le microscope à fluorescence a été correctement aligné, préparé (lampe, filtres etc...).

Le contrôle positif [bmd](#) anti-keratin (Réf. IMM 2245) peut être utilisé comme contrôle de qualité externe.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Les **coupes d'œsophage de rat (IF)** sont une aide précieuse au diagnostic. Cependant, elles ne peuvent être utilisées seules pour poser le diagnostic. Tous les tests doivent être interprétés par un spécialiste en fonction de l'historique du patient.

Le choix du microscope se fera de façon à ce que les optiques, sources lumineuses et filtres correspondent aux normes établies par les organismes de contrôle de qualité. Cette standardisation est capitale pour comparer des images et des titres obtenus dans différents laboratoires.

La sensibilité du test peut être influencée par plusieurs facteurs extérieurs aux composants. Il est recommandé aux utilisateurs de tenir compte des facteurs environnementaux comme le système optique, la conservation et la manipulation des réactifs et échantillons, le technicien observateur, etc...

Les échantillons détectés positifs au 1/10 doivent être de nouveau dilués. Tous les échantillons positifs doivent être titrés le plus loin possible en utilisant des séries de dilutions de raison 2, 1/20, 1/40, etc. Le titre final est donné par la dilution la plus élevée qui produit un résultat positif.

CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES

L'étude a été réalisée sur 22 sérums par une technique d'immunofluorescence indirecte. Les coupes d'œsophage de rat sur lame de [bmd](#) (A) ont été testées en parallèle avec les lames d'un autre fournisseur (B). Les échantillons ont été dilués au 1/20^{ème}.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau ci-dessous :

ASPECT	Lames (A)	Lames (B)
<i>Positif</i>	7	7
<i>Négatif</i>	15	15

Cette étude a été effectuée en deux séries différentes avec deux numéros de lots différents, afin de tester sa reproductibilité. Le contrôle positif s'est révélé positif dans chaque série avec les lames (A). La reproductibilité qualitative est bonne.

Sensibilité relative (7/7) : 100%

Spécificité relative (14/14) : 100%

Concordance des résultats (22/22) : 100%

BIBLIOGRAPHIE

1. Paimela L. ; et al. Antikeratin antibodies : diagnostic and pronostic markers for early rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic diseases* 1992 ; 51 ; 743-746.
2. Youinou P., Le Roux A.M. Les anticorps anti-kératine réhabilités. *Le concours médical*, 12-10-1985-107-36pp 3406-3408.
3. Vincent C ; Youinou P ; Serre Guy (1999) – Auto-anticorps anti filaggrine – Autoanticorps marqueurs des maladies auto-immunes – bmd Editions Elsevier p 225.
4. Humbel RL (1994) – Connectivites – Auto-anticorps et maladies auto-immunes. Editions Option Bio Elsevier version N°1 – p.71.
5. Meyer O. (2003) – Devant un rhumatisme inflammatoire, quels auto-anticorps demander et quand ? *Revue du rhumatisme* 2003, vol 70, n°10-11 pp 803-817.










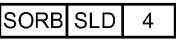

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	QUANTITÉ À DISTRIBUER	REACTIFS	CONDITIONS D'INCUBATIONS
INCUBATION DES SERUMS	40 µl 1 goutte 1 goutte	Echantillons dilués Contrôle positif (prêt à l'emploi) Contrôle négatif (prêt à l'emploi)	30 mn à T.A.
<i>Renouveler l'opération pour chaque lame</i>			
LAVAGE EN TAMPON PBS	⇒ Eliminer les sérums d'un geste sec au dessus d'une poubelle ou sur du papier absorbant pour éviter les contaminations. ⇒ Rincer brièvement la lame avec le tampon PBS. ⇒ Immerger la lame dans un bain de tampon PBS. N.B : L'agitation n'est pas nécessaire		10 mn à T.A
<i>Eliminer l'excès de PBS à l'aide des buvards fournis (*) – Pratiquer un séchage uniforme et sans frottement à l'aide d'un rouleau</i>			
INCUBATION DU CONJUGUÉ	1 goutte par puits	immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines marquées à la fluoresceïne (prêt à l'emploi)	30 mn à T.A. à l'abri de la lumière directe
<i>Vérifier que tous les puits sont parfaitement recouverts</i>			
RINÇAGE EN TAMPON PBS	⇒ Eliminer le conjugué d'un geste sec au dessus d'une poubelle pour éviter les contaminations. ⇒ Rincer brièvement la lame avec le tampon PBS. ⇒ Immerger la lame dans un bain de tampon PBS. N.B : L'agitation n'est pas nécessaire		10 mn à T.A
<i>NE PAS SECHER LA LAME AVEC UN BUVARD (*)</i>			
MONTAGE	3-4 gouttes entre les puits	Milieu de Montage (prêt à l'emploi)	-
LECTURE	La lecture est réalisée au microscope à fluorescence à l'aide de l'objectif (x10 - x25 - x40)		

(*) Ne pas laisser sécher les puits des lames. Chaque dépôt doit s'effectuer immédiatement.

T.A : Température Ambiante

LÉGENDE DES SYMBOLES

	Risque Biologique		Conserver à		Numéro de catalogue
	Lire le manuel d'utilisation		Pour le diagnostic in vitro uniquement		Numéro de lot
	Nombre de tests		A utiliser avant		Communauté Européenne
	Lame de 4 puits		Test en immunofluorescence indirecte		

BioMédical Diagnostics SA

Siège Social

Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tel : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com



Anti-Keratin (IF) - Rat esophagus sections

REF | ME 0131 Substrat slide (4 wells)

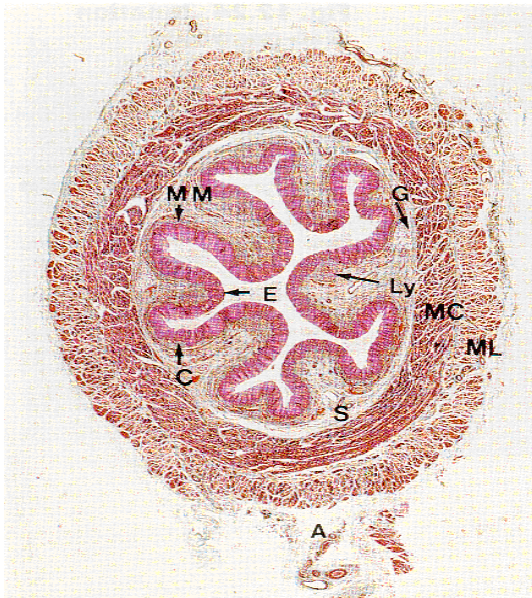
INTENDED USE

The section of rat esophagus is used for the screening anti-keratin antibodies in Rheumatoid Arthritis (RA) patients using indirect immunofluorescence method.

DIAGNOSTIC VALUE

The polyarthritis rheumatoid is most frequently observed chronic inflammatory rheumatism. The anti-keratin antibodies are a specific marker of the polyarthritis rheumatoid. They are present in 50% of seropositive polyarthritis and 20% of the seronegatives forms, but are not found in other inflammatory rheumatism.

These antibodies are bind on the keratinized stratified squamous epithelium which surround the light of the lower third of the esophagus.



This section is doing in lower third of the esophagus and shows the basic layers of the gastro-intestinal tract. The lumen is surrounded by the tunica mucosa (E); the lining of the esophagus in all species is stratified squamous epithelium, and in most animals (like rodents) it's keratinized, sometimes quite heavily. The underlying chorion C contains lymphoid cells (Ly). Although few details are visible at this very low magnification, you can see that it is a muscular tube lined with epithelium (MM). The submucosa (S) secretes mucus from mucous glands (G) which are observed primarily only on the lower third area of the oesophagus. The tunica muscularis is clearly defined as two layers, one inner (MC) and one outer (ML) composed of smooth muscle fibers that separates the tunica mucosa from the tunica submucosa. Because the first part of swallowing is under voluntary control, the beams of stratified muscle prevail in the muscularis one of the higher third of the esophagus. Outboard of tunica muscularis, the "tunica adventitia" A, very richly vascularized is continuous by the adjacent areolar conjunctive tissue. Esophageal mucous membrane relaxed presents many deep folds; this layout allows an important distension during the passage of food.

PRINCIPLE OF THE TEST

Anti-keratin antibodies are detected by indirect immunofluorescence on sections of rat oesophagus (made in the keratinized lower third) with a fluorescent conjugate.

First:

Sections of rat esophagus on microscope slides are overlaid with diluted patient's serum and incubated to allow the anti-keratin antibodies – present in positive sera – to bind to the antigen sites in the oesophagus tissue.

Second:

Sites where the anti-keratin antibodies reacted with the substrate are made visible by the binding of the fluorescently labelled anti-human IgG globulin (the conjugate).

COMPONENTS

		ME 0131
Substrate Slide (section of rat esophagus in multiple well-slides)	SORB SLD 4	1 slide of 4 wells
Blotter for drying the substrate slides around the wells.		1

REAGENTS AVAILABLE INDIVIDUALLY

ME 902.2	Fluorescent anti-IgG conjugate (2 mL)
ME 902.8	Fluorescent anti-IgG conjugate (8 mL)
IMM 2245	Anti-keratin positive control (0,5mL)
HME NEG	Negative control (500 µL)
HME MM	Mounting Medium buffered glycerol (3,5mL)
HME PBS10	One-liter packet of dry PBS 10g (10x1L)
HME 12CS	24x60mm glass coverslips (100 units)

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Volumetric pipettes to deliver 10-15 µL
- Small test tubes and rack or U-bottom microtitration plates
- Humid chambers – Petri dishes with moist filter paper
- Coplin staining jars with slide holders
- One liter volumetric flask or graduated cylinder
- Squeeze bottle for PBS
- Cover glasses #1, 24 x 60 mm.
- Distilled water
- Fluorescence microscope
- Timer
- Forceps

SPECIMEN COLLECTION

- Collect blood specimens in plain untreated tubes.
- After clot formation, immediately harvest the serum.
- The serum specimens may be stored in a refrigerator (+2°C-+8°C) for up to 48 hours. If longer storage is desired, store at -20°C.
- Turbidity, haemolysis, bacterial growth or drugs capable of fluorescing in the serum may adversely affect the performance of the test. Do not use hemolyzed or lipemic sera.
- Specimen should be handled as though they contained agents infectious to humans

STABILITY AND STORAGE

- Expiration dates for substrates (slides), conjugate and controls are given for storage at -20°C or below.

We recommend to use with this substrate, the reagents listed above § "REAGENT AVAILABLE INDIVIDUALLY".

- Once thawed the conjugate is stable for 90 days when stored at +2° to +8°C. Do not alicote the conjugate at -20°C.
- Repeated freezing and thawing should be avoided since it is detrimental to the products.
- The mounting medium is stable until the expiration date when stored in the refrigerator.
- The PBS powder can be stored at room temperature until its expiration date.

PRECAUTIONS

All bmd Test Kit components are for *in vitro* diagnostic use ONLY.

Do not use components or reagents beyond their expiration dates. All reagents must be at room temperature before use (at least 15 mn).

After freezing, use each slide immediately after opening the envelope to avoid the drying of the wells.

In order to avoid damaging the substrate:

- Apply each drop on the surround of wells in order to touch the substrate with the tip of the pipette.
- During the wash step, do not rince the slides with a pipette or squeeze (wash) bottle.
- Do not apply any pressure on the slide during to mount the cover glasses.
- Do not move the substrate slide after adding the mounting medium buffered.
- Avoid using pen to identify the slide.
- **Always avoid mouth pipetting.**

SET-UP

All substrate slides must be at room temperature before use.

1. Preparation of the wash and dilution buffer

- Reconstitute buffer pack with one liter distilled water. Wait 10 mn before use
- Storage period : 4 weeks at +2°C/+8°C

2. Sera dilution

- Dilute freshly collected and properly stored patient serum 1:10 in PBS.
For titrations, set up doubling dilutions, i.e. 1:20, 1:40, etc.
- Mix with vortex

TEST PROCEDURE

1. Incubation of samples

- Identify wells which are going to contain positive and negative control sera and patient's serum dilutions.
- Remove slide from protective envelopes and put into the humid chamber
- In the identified well of the slide, add
 - **40µL** of diluted sample, **by avoiding to touch the substrate with the tip of the pipette.**
 - 1 drop of ready to use positive control
 - 1 drop of ready to use negative control
- Do the same with each slide.
- Incubate for 30 minutes at room temperature.

Do not let the wells dry out

2. Wash with PBS

- Remove slides from humid chamber.
- Tap each slide quickly on its side to avoid contaminations.
- Dip the slides several times in a beaker containing fresh PBS. **Do not use wash bottle to rinse the slides.**
- Immediately place slides in a slide holder or a coplin jar and wash with PBS and incubate for 10 minutes at room temperature. Agitation is advised but not useful.

Note: If more than 10 slides are tested, wash two time in PBS bath (5 minutes each).

⚠ Extended incubation and improper washing may result in poor morphology of substrate and increased background fluorescence.

3. Incubation of Conjugate

- Remove slides from PBS.
- Eliminate excess of PBS onto some absorbent paper.
- Blot the slides with blotters provided to dry around the wells and put into the humid chamber.
- Immediately apply 1 drop of conjugate to each well to cover substrates.
- Incubate for 30 minutes at room temperature and **far from light.**

Do not let the wells dry out

4. PBS rinse

- Repeat Step 2 "Wash with PBS".

5. Mount Cover glasses

- Apply 3 or 4 drops mounting medium to each slide.
- Cover with cover glasses – Lateral movement and pressure will damage the substrate

6. Reading

It is recommended to examine the day of the test with an appropriately equipped fluorescence microscope (x10) and use microscopes (x25 or x40) to confirm a positive fluorescence.

Note: If delay in examining slides is anticipated, seal coverglass with clear nail polish and store in refrigerator.

INTERPRETATION OF RESULTS

Starts the reading with a dilution of 1:10. For all positive readings at dilution of 1:10 : doubles with every successive dilution, so the next specimen tested is 1:20, then 1:40, 1:80, and 1:160.

Auto-antibodies detected	Cutt off
Anti-Keratin antibodies	$\geq 1/10$

Positive reaction

A positive reaction results in apple green fluorescence pattern in the stratum corneum of rat esophagus epithelium.

All positive results should be tested again 2 months later and interpreted according to the biological and clinical context.

Negative reaction

A simple apple/green fluorescence border should not be interpreted as positive.

QUALITY CONTROL

When results obtained are distant from expected values, test run should be repeated. Should atypical observations continue, we recommend to investigate if :

- adequate amount of serum is applied on the wells
- wells were allowed to dry out during incubation of serum or conjugate
- there is any sign of microbial contamination of the liquid reagents due to incorrect storage and handling. If turbidity appears on any of the liquid reagents, discard and use another batch.
- Fluorescence microscope is properly aligned, using correct bulb, correct filters, etc...

bmd anti-keratin positive control (Cat. IMM 2245) can be used as an external quality control.

LIMITATIONS OF THE TEST

The **substrate slide of rat esophagus** is a valuable diagnostic aid. However, it should not be considered diagnostic by itself alone. All tests should be interpreted by a medical authority in light of all patients conditions.

Sensitivity of the test kit may be influenced by several factors aside from the components. We recommend user to take note of factors such as optical system, improper storage and handling, technician / observer, etc.

Samples that were screened positive at 1:10 should be further diluted. All positive sera should be titrated to the highest titre using a series of doubling dilutions, i.e. 1:20, 1:40, etc. The end point titre is the highest dilution that produces a positive result.

EXPECTED VALUES

Endomysial antibodies are present in almost 100% patients with celiac disease, 70% of patients with dermatitis herpetiformis, and in about 20% of patients with other enteropathies^(3,4).

There is a small percentage of IgG AEmA that will be negative IgA when screened. A negative result exhibited by a patient with overt clinical symptoms may be considered for IgG testing.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The study was performed on 22 serums with a method of immunofluorescence indirect. The bmd substrate slide of rat esophagus (A) were tested in parallel with the substrate slide of rat esophagus of another supplier (B). Samples were diluted at 1/20.

Results of this evaluation are reported in the following table:

APPEARENCE	Slides (A)	Sildes (B)
<i>Positive</i>	7	7
<i>Negative</i>	15	15

This study was made on two different series and with two different batches, in order to test the reproducibility. Positive control appeared positive in each series with the substrate slide (A). Qualitative reproducibility is good.

Relative sensibility(7/7) : 100%

Relative specificity (14/14) : 100%

Concordance of results (22/22) : 100%

BIBLIOGRAPHY

1. Paimela L. ; et al. Antikeratin antibodies : diagnostic and pronostic markers for early rheumatoid arthritis. Annals of Rheumatic diseases 1992 ; 51 ; 743-746.
2. Youinou P., Le Roux A.M. Les anticorps anti-kératine réhabilités. Le concours médical, 12-10-1985-107-36pp 3406-3408.
3. Vincent C ; Youinou P ; Serre Guy (1999) – Auto-anticorps anti filaggrine – Autoanticorps marqueurs des maladies auto-immunes – bmd Editions Elsevier p 225.
4. Humbel RL (1994) – Connectivites – Auto-anticorps et maladies auto-immunes. Editions Option Bio Elsevier version N°1 – p.71.
5. Meyer O. (2003) – Devant un rhumatisme inflammatoire, quels auto-anticorps demander et quand ? Revue du rhumatisme 2003, vol 70, n°10-11 pp 803-817.










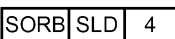

SUMMARY OF METHOD

	AMOUNT TO BE DISTRIBUTED	REAGENTS	INCUBATION CONDITIONS
INCUBATION OF SAMPLES	40 µL	Diluted samples	30 mn at R.T
	1 drop	Positive control (ready to use)	
	1 drop	Negative control (ready to use)	
<i>Do the same with each slide</i>			
PBS WASH	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Tap each slide quickly on its side or onto absorbent paper to avoid contaminations ⇒ Dip the slides several times in a beaker containing fresh PBS ⇒ Place slides in a slide holder or a coplin jar and wash with PBS. N.B : Agitation is not useful. 		10 mn at R.T
<i>Eliminate excess of PBS with the blotters provided (*) – Dry uniformly and without friction using a roller</i>			
INCUBATION OF CONJUGATE	1 drop to each well	Fluorescein conjugated Affinipure Goat anti-human IgG (ready to use)	30 mn at R.T in the dark
<i>Verify that all wells are perfectly covered</i>			
PBS RINSE	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Tap quickly each slide on its side to eliminate the conjugate. ⇒ Dip the slide several times in a beaker containing fresh PBS. ⇒ Place slides in a slide holder or a coplin jar and wash with PBS. N.B : Agitation is not useful. 		10 mn at R.T
<i>DO NOT ELIMINATE EXCESS OF PBS (Teflon) (*)</i>			
MOUNT COVER GLASSES	3-4 drops to each slide	Mounting Medium (ready to use)	-
READING	Examine with an appropriately equipped fluorescence microscope (x 10 – x 25 - x 40).		

(*) **Do not let wells dry out.** Every deposit must be made at once.

R.T : Room Temperature

SYMBOLS USED

	Biological risks		Temperature limitation		Catalogue Number
	Consult instructions for use		In Vitro Diagnostic Medical Device		Batch Code
	Number of tests		Use by		EC Declaration of Conformity
	Slide of 4 wells		Immunofluorescent assay		

BioMédical Diagnostics SA

Office
Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tel : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com

