

Coupes spécifiques d'organes

REF | ME 0600 | **Lame de substrat (4 puits)**

DÉFINITION

Les **coupes spécifiques d'organes** ([bmd](#)) constituent une méthode qualitative et semi quantitative de détection des autoanticorps par immunofluorescence indirecte dans le sérum humain. Ces lames contribuent à l'établissement du diagnostic de certaines maladies auto-immunes énumérées ci-dessous :

Référence	Substrat	Pathologies auto-immunes
ME 0600 AG	Glande surrénale	Maladie d'Addison primaire
ME 0600 BM	Moelle osseuse	Anémie hémolytique
ME 0600 BR	Cerveau	Schizophrénie
ME 0600 CO	Colon	Colite ulcéreuse chronique
ME 0600 HE	Cœur	Infarctus du myocarde
ME 0600 LI	Lèvre	Pemphigus, pemphigöide
ME 0600 LU	Poumon	Syndrome de Goodpasture Syndrome de Hamman-Rich
ME 0600 OV	Ovaire	Insuffisance sexuelle Défaillance prématurée des ovaires
ME 0600 PG	Hypophyse	Maladies endocrines
ME 0600 SG	Glande salivaire	Syndrome de Sjögren
ME 0600 SN	Nerf sciatique	Sclérose Syndrome de Guillain-Barré
ME 0600 TE	Testicule	Défaillance testiculaire Stérilité
ME 0600 SM	Muscle strié	Myasthénie grave

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Exemples :

Anticorps anti-muscle strié (ASKMA) : la myasthénie est un désordre de la transmission neuromusculaire. Cette maladie est caractérisée par une faiblesse musculaire et une grande fatigabilité.

Des études cliniques sur l'âge et le sexe des malades montre une prévalence féminine chez les patientes de moins de 40 ans et masculine chez les patients de plus de 60 ans.⁽¹⁾

Des auto-anticorps circulants dirigés contre les récepteurs de l'acétylcholine (anti-RACH) ont été détectés chez 75 à 90% des patients myasthéniques^(2,5).

Ces auto-anticorps sont importants dans la myasthénie mais des études indiquent qu'ils ne sont pas les seuls responsables des signes cliniques observés, des facteurs épithéliaux thymiques semblent être impliqués.⁽³⁾

Mc Farlin, Johnson et Seymour (1968) ont trouvés que les anticorps anti-muscle strié (ASKMA) de patients atteints de myasthénie étaient de spécificité IgG⁽⁴⁾.

Anticorps anti-surrénales (AAdA) : Les anticorps anti-corticosurrénales sont retrouvés dans la maladie d'Addison⁽⁶⁾.

Anticorps anti-glandes salivaires : Les anticorps anti-glandes salivaires sont retrouvés dans le syndrome de Sjögren. Ces anticorps se fixent au niveau des cellules épithéliales des tubes excréteurs. A noter cependant que d'autres auto-anticorps non spécifiques d'organe, peuvent marquer les glandes salivaires, et en particulier les anticorps anti-mitochondrie de type 2.

PRINCIPE DU TEST

L'immunofluorescence indirecte est une méthode couramment utilisée pour la détection des auto-anticorps.

Etape N°1 :

Les substrats sont recouverts de sérum de patients et incubés pour permettre la fixation des auto-anticorps présents dans le sérum.

Etape N°2 :

Les sites ayant fixé les auto-anticorps sont mis en évidence par un conjugué anti-humain 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 DES COFFRETS

ME 0600	
Lame de substrat (Coupes de tissus de singe sur des lames à puits multiples) <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">SORB SLD 4</div>	1 lame de 4 puits
Buvard pour essuyer autour des puits	1

REACTIFS DISPONIBLES INDIVIDUELLEMENT

ME 902.2	Conjugué fluorescent anti-IgG (2 ml)
ME 902.8	Conjugué fluorescent anti-IgG (8 ml)
ME 0904	Conjugué fluorescent anti-IgA (2 ml)
HME NEG	Contrôle négatif (500 µl)
HME MM	Milieu de Montage Glycérol (3,5 ml)
HME PBS10	Sachet de PBS en poudre 10g (10x11)
HME 12CS	Lamelles de verre 24x60mm (100 unités)
bmd propose des contrôles positifs sur demande, nous consulter.	

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
- Pincettes
- Papier absorbant

ECHANTILLONS

- 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 48 heures maximum à +2°C-+8°C. Pour des conservations prolongées, les congeler 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 TOUS 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 ces substrats les réactifs cités précédemment dans le § « REACTIFS DISPONIBLES INDIVIDUELLEMENT ».

- *Après décongélation, le conjugué (ME 902.2 ou 902.8) 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 **coupes spécifiques d'organes** de primates () sont uniquement destinés à une utilisation de diagnostic *in vitro*.

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

Ramener tous les réactifs à température ambiante au moins 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 pas pipeter avec la bouche.**

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Avant la manipulation, ramener tous les réactifs à température ambiante.

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.
Ex : 20 µl d'échantillon + 180 µl de PBS
- Agiter au vortex

MODE OPÉRATOIRE

1. Incubation des sérums

- Identifier les puits qui contiendront les contrôles positif et 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 incuber 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 et laisser la plaque s'égoutter sur du papier absorbant.
- Rincer brièvement les lames plusieurs fois dans un bain de PBS frais. **Ne pas utiliser de bouteille de lavage pour rincer les lames.**
- Immerger ensuite les lames dans un portoir à lames contenant un bain de PBS frais et laisser incuber 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.
- Eliminer l'excès de PBS 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 (40 µl) dans chaque puits.
- S'assurer que tous les puits soient parfaitement recouverts.
- Laisser incuber 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 x 10 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, réaliser un dosage par des dilutions successives de raison 2.

Si plus d'un auto-anticorps est présent dans le sérum du patient, des interférences peuvent se produire, le titrage de chacun doit être effectué.

Aucune association définitive entre l'aspect de la fluorescence et une maladie spécifique ne devra être faite. A titre d'exemple SEULEMENT, certaines corrélations ont été reportées dans le tableau ci-dessous.

Exemples à titre indicatif :

Anticorps Recherchés	Classe Ig	Seuil de positivité	Principales association
Anti-surrénales	IgG	1/5	Maladie de Addison Adrénalitis Maladies auto-immunes idiopathiques...
Anti-coeur	IgG	1/10	Cardiomyopathie Dilatation du myocarde Infarctus Fièvre rhumatoïde aigue
Anti-muscle strié	IgG	1/60	Myasthénie
Anti-ovaires	IgG	1/10	Polyendocrinopathie de type I
Anti-hypophyse	IgG	1/10	Insuffisance hypophysaire primitive Maladie de Cushing Diabète

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle positif et négatif doivent être inclus à chaque série test.

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...).

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Les lames de détection ([bmd](#)) des auto-anticorps spécifiques d'organe sont une aide précieuse au diagnostic. Cependant, ils ne peuvent être utilisés seuls pour poser le diagnostic. Tous les tests doivent être interprétés par un spécialiste en fonction de l'historique du patient.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Nicholson, G.A, McCleod.JG, Griffiths, LR, comparison of diagnostic tests in myasthenia Gravis, Clin Exp Neurol. 18:45, 1982.
- 2 Gotti C , Mantegazza R. And Clementi F : new Antigen for Antibody Detection in Myastheniae Gravis, Neurol 34:374-77, 1984.
- 3 Gihlus N.E, Aarli JA, Matre R, Myasthenia Gravis, The specificities of skeletal Muscle and thymus antibodies.
- 4 Irvine, WJ; Kalden, JR: Muscle in allergic disease. In Clinical Aspects of immunology.Ch 51. Gell, PGH, coombs, RRA and Lackmann, PJ (Eds) Blackwell Scientific Publication , Oxford Engand 1975
- 5 Yamamoto AM et Bach JF (1999) – Autoanticorps anti-récepteurs de l'Acétylcholine (RACH) et myasthénie - Autoanticorps marqueurs de maladies auto-immune. bmd Editions p.393
- 6 Humbel RL (1994) – Endocrinopathie auto-immune – Auto-anticorps et maladies auto-immunes Editions Option Bio Elsevier version N°1 – p.207.










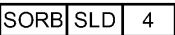

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

	QUANTITÉ À DISTRIBUER	REACTIFS	CONDITIONS D'INCUBATIONS
INCUBATION DES SERUMS	40 µl	Echantillons dilués	30 mn à T.A.
	1 goutte	Contrôle positif (prêt à l'emploi)	
	1 goutte	Contrôle négatif (prêt à l'emploi)	
<i>Renouveler l'opération pour chaque lame</i>			
LAVAGE EN TAMPON PBS	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Eliminer les sérums 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>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	Conjugué (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	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ 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 (x 10 - x 25 - x 40)		

(*) 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




Organ-specific sections

REF

ME 0600

Substrat slide (4 wells)

INTENDED USE

The **sections of specific-organs** of primate monkey () are used for the qualitative and semi-quantitative detection of human autoantibodies by indirect immunofluorescence method. These substrate slides are useful in the diagnosis of certain autoimmune disorders listed below.

Catalog No	Substrate	Autoimmune disorders
ME 0600 AG	Adrenal gland	Idiopathic Addison's disease
ME 0600 BM	Bone marrow	Hemolytic anemia
ME 0600 BR	Brain	Schizophrenics
ME 0600 CO	Colon	Chronic ulcerative colitis
ME 0600 HE	Heart	Myocardial infarction
ME 0600 LI	Lip	Pemphigus, pemphigoid
ME 0600 LU	Lung	Goodpasture's syndrome Hamman-Rich Syndrome
ME 0600 OV	Ovary	Gonadal failure, Premature ovarian
ME 0600 PG	Pituitary Gland	Endocrine diseases
ME 0600 SG	Salivary Gland	Sjögren's syndrome
ME 0600 SN	Sciatic Nerve	Sclerosis Guillian-Barre syndrome
ME 0600 TE	Testes	Testicular failure, Infertility
ME 0600 SM	Striated Muscle	Multiple Sclerosis Guillian-Barre syndrome

DIAGNOSTIC VALUE

Example:

Anti-Skeletal muscle antibodies (ASkMA): the myasthenia gravis is a neuromuscular disease leading to fluctuating muscle weakness and fatigability.

Clinical studies on the age and sex distribution clearly show a prevalence of females in patients below the age of 40 years in contrast a higher incidence of males in patients over 60 years.⁽¹⁾

Circulating anti-acetylcholine receptor (AChR) antibodies have been detected in 75% to 90% of myasthenic patients.^(2,5)

Antibodies to the acetylcholine receptor are important in the pathogenesis of myasthenia gravis (MG) but recent studies indicate they are not solely responsible for the clinical features of the disease, since thymic epithelial factors may also be implicated.⁽³⁾

Mc Farlin, Johnson & Seymor (1968) found that the skeletal muscle antibodies (ASkMA) in patients with MG belong to the IgG class⁽⁴⁾.

Anti-adrenal antibodies (AAdA): Antibodies anti-adrenal cortex are found in patients with Addison's disease⁽⁶⁾.

Anti-salivary gland antibodies: the development of anti-salivary gland antibodies which occur in Sjogren's syndrome. These antibodies bind to excretion canal of epithelial cells.

However non-organ-specific auto-antibodies can bind to the salivary glands and especially the antimyochondrial antibodies of type 2 (AMA-M2).

PRINCIPLE OF THE TEST

Indirect immunofluorescence is a method usually used in the detection of autoantibodies.

First:

The substrate sections of monkey on microscope slides are overlaid with diluted patient's serum and incubated to allow the antibodies present in positive sera.

Second:

Sites that bind to antibodies are made visible with a fluorescently labelled antihuman antibodies (the conjugate).


In the fluorescence microscope, a positive reaction results in an apple green fluorescence pattern of the characteristic structural features of the substrate sections.

COMPONENTS

	ME 0600
Monkey substrate slides (specific sections of monkey in multiple well-slides) <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">SORB SLD 4</div>	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)
ME 0904	Fluorescent anti-IgA conjugate (2 mL)
HME NEG	Negative control (500 µL)
HME MM	Mounting Medium buffered glycerol (3,5 mL)
HME PBS10	One-liter packet of dry PBS 10g (10x1L)
HME 12CS	24x60mm glass coverslips (100 units)

 can provide you **positive controls**, please contact us.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

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 date for slides (tissue substrates) is 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 and controls are 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 substrate slides 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 direct pressure.
- Avoid using pen to identify the slide.
- **Always avoid mouth pipetting.**

SET-UP

All reagents 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.
Ex : 20µL serum + 180µL PBS
- 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 and let the sera run off onto absorbent paper.
 - 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 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 the slide from PBS
- Eliminate excess of PBS onto some absorbent paper.
- Blot the slide with blotter provided 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 of mounting medium to each slide
- Cover with a #1 glass coverslip – Pressing or laterally moving the coverslip will damage the substrate.

6. Reading

It is recommended to examine the day of the test with an appropriately equipped fluorescence microscope (x 10) and to use (x25 or x40) microscopes 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

All positive sera should be titrated to the highest titer using a series of doubling dilutions. If more than one antibody is present in the patient's serum, interference may occur. Titration of such serum may reveal first one and then another autoantibody.

No definitive association between the fluorescence pattern and any specific disease should be made. As a reference ONLY, certain correlations that have been cited are shown in the table below.

Examples:

Substrate	Ig class	Cut Off	Major disease association(s)
Adrenal gland	IgG	1/5	Addison's disease Adrenatitis Idiopathic disease
Heart	IgG	1/10	Cardiomyopathy Dilated myocarditis Infarctions Acute rheumatic fever
Skeletal muscle	IgG	1/60	Myasthenia gravis disease
Ovary	IgG	1/10	Polyendocrinopathy syndrome type 1
Pituitary Gland	IgG	1/10	Hypophyseal fealure primary Cushing disease Diabete mellitus

QUALITY CONTROL

On each run, both positive and negative controls, should be included.

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...

LIMITATIONS OF THE TEST

This test is a valuable diagnostic aid. However, it should not be considered diagnostic by itself alone. Positive results may be obtained with sera of apparently healthy people as a result of many factors. Therefore, all test results should be interpreted by a medical authority in light of all known patient's conditions.

BIBLIOGRAPHY

- 1 Nicholson, G.A, McCleod.JG, Griffiths, LR, comparison of diagnostic tests in myastenia Gravis, Clin Exp Neurol. 18:45, 1982.
- 2 Gotti C, Mantegazza R. And Clementi F : new Antigen for Antibody Detection in Myasteniae Gravis, Neurol 34:374-77, 1984.
- 3 Gihlus N.E, Aarli JA, Matre R, Myastenia Gravis, The specificities of skeletal Muscle and thymus antibodies.
- 4 Irvine, WJ; Kalden, JR: Muscle in allergic disease. In Clinical Aspects of immunology.Ch 51. Gell, PGH, coombs, RRA and Lackmann, PJ (Eds) Blackwell Scientific Publication , Oxford Engand 1975
- 5 Yamamoto AM et Bach JF (1999) – Autoanticorps anti-récepteurs de l'Acétylcholine (RACH) et myasthénie - Autoanticorps marqueurs de maladies auto-immune. bmd Editions p.393
- 6 Humbel RL (1994) – Endocrinopathie auto-immune – Auto-anticorps et maladies auto-immunes Editions Option Bio Elsevier version N°1 – p.207.










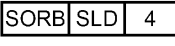

SUMMARY OF METHOD

	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	⇒ Tap each slide quickly on its side to avoid contaminations ⇒ 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>Eliminate excess of PBS on Teflon with the blotter(*) - Dry uniformly and without friction using a roller</i>			
INCUBATION OF CONJUGATE	1 drop to each well	Fluorescein conjugated Affinipure (ready to use)	30 mn at R.T in the dark
<i>Verify that all wells are perfectly covered</i>			
PBS RINSE	⇒ 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 – x25 - x 40).		

(*) Do not let wells dry out. Every deposite 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

