

Endomysium (AEmA) IF

REF

ME 0648 ESD

Coffret

48

ME 0604 ESD

Lame de substrat (4 puits)

ME 0696 ESD

Coffret

96

ME 0608 ESD

Lame de substrat (8 puits)

DEFINITION

Le coffret **Endomysium (AEmA)** est un test d'immunofluorescence indirecte destiné à la détection qualitative et semi-quantitative des auto-anticorps endomysium de classe IgA dans le sérum humain. Ce test contribue à l'établissement du diagnostic de la maladie coeliaque et d'autres pathologies associées telle la dermatite herpétiforme.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

La maladie coeliaque, considérée comme une maladie auto-immune, est une affection gastro-intestinale chronique induite, essentiellement chez l'enfant, par le gluten. Dans la quasi-majorité des cas de maladie coeliaque et 70 % des cas de dermatite herpétiforme⁽¹⁾, des anticorps anti-endomysium de classe IgA sont présents. Chez la plupart des patients atteints de maladie coeliaque, les symptômes et les titres en anticorps anti-endomysium déclinent dès qu'un régime alimentaire sans gluten est suivi⁽³⁾. Ainsi, la détection des anticorps anti-endomysium peut être utilisée pour le diagnostic de la maladie coeliaque ainsi que pour le contrôle de l'évolution de la maladie^(10,11).

La dermatite herpétiforme est une affection cutanée vésicobulleuse très purigineuse caractérisée cliniquement par des lésions d'urticaire et des papules excoriées. Toutes les parties du corps peuvent être touchées mais les lésions se répartissent généralement de manière symétrique sur la face d'extension des membres (coudes, genoux), le tronc et les fesses^(5,6,9).

La maladie coeliaque, due à une intolérance aux protéines de blé, orge, seigle et avoine (gluten et ses fractions), se traduit par une malabsorption et des dommages sévères de la muqueuse de l'intestin grêle. L'incidence de cette entéropathie au gluten se situe entre 1 pour 300 et 1 pour 6500. Un diagnostic définitif nécessite généralement des biopsies intestinales répétées, un régime contrôlé et un suivi prolongé⁽²⁾.

PRINCIPE DU TEST

Les anticorps anti-endomysium, spécifiques d'espèces et d'organes⁽³⁾, sont détectés par immunofluorescence indirecte sur des coupes d'œsophage de primate (partie distale), où ils réagissent avec l'endomysium ou la réticuline des fibres des muscles lisses.

Étape N°1 :

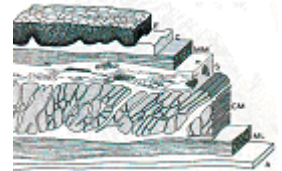
Des coupes d'œsophage distal de primate immobilisées sur des lames sont recouvertes de sérum dilué et incubées afin que les anticorps anti-endomysium, présents dans le sérum positif, se lient aux sites antigéniques des coupes de tissus.

Étape N°2 :

Les sites de réactivité des anticorps anti-endomysium, sont révélés par la fixation d'un anticorps anti-IgA humaines fluorescent (Conjugué).



Cette microphotographie montre à un plus fort grossissement l'aspect typique de la paroi œsophagienne en section longitudinale.



E : Épithélium pavimenteux stratifié
C : Chorion
MM : Musculaire muqueuse
S : Sous-muqueuse
CM : Muscleuse : couche circulaire
ML : Muscleuse longitudinale
A : Adventice

COMPOSITION DES COFFRETS

	ME 0648	ME 0696
Lames Endomysium (Coupes d'œsophage distal de singe sur des lames à puits multiples) SORB SLD n	12 x 4 puits	12 x 8 puits
Conjugué anti-IgA Flacon contenant des immunoglobulines de chèvre anti-IgA humaines, marquées à la fluorescéine en tampon phosphate PBS, avec 1 % de BSA. Prêt à l'emploi CONJ DTAF IgA	1 x 3 ml	1 x 3 ml + 1 x 2 ml
Contrôle Positif anti-endomysium (AEmA) Sérum positif produisant une fluorescence spécifique de l'endomysium ou les composants de la réticuline des fibres de muscles lisses de l'œsophage distal. Prêt à l'emploi CONTROL AEmA	1 x 0,5 ml	1 x 0,5 ml
Contrôle Négatif Sérum négatif ne produisant aucune fluorescence de l'endomysium sur l'œsophage distal. Prêt à l'emploi CONTROL -	1 x 0,5 ml	1 x 0,5 ml
Tampon Phosphate (PBS) PBS en poudre (0.01 M. pH 7.4 = 0.2) chaque sachet contient de quoi reconstituer 1 litre de tampon. 1 sachet (10g) + 1 l d'eau = 1 litre de PBS BUF WASH RCNS 1L H ₂ O A reconstituer	2 sachets	2 sachets
Milieu de Montage Flacon compte-gouttes de glycérol dilué. Prêt à l'emploi MM	3 ml	3 ml
Buvards pour essuyer autour des puits	12	12

MATERIEL NECESSAIRE 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
- Bécher pour le PBS
- Lamelles de verre de 24x60 mm
- Eau distillée
- Microscope à fluorescence
- Chronomètre
- Pincettes

REACTIFS DISPONIBLES INDIVIDUELLEMENT

ME 0604 ESD	Lame Endomysium de 4 puits
ME 0608 ESD	Lame Endomysium de 8 puits
ME 0904	Conjugué fluorescent anti-IgA (2 ml)
ME 0062 ESD	Contrôle positif anti-endomysium AEmA (0,5 ml)
HME NEG	Contrôle négatif (500 µl)
HME MM	Milieu de Montage Glycérol (3,5 ml)
HME PBS10	Sachet de PBS en poudre 10g (10x1l)
HME 12CS	Lamelles de verre 24x60mm (100 unités)

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, 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.

STABILITE ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Les dates de péremption des lames, contrôles et conjugué sont établies pour une conservation à -20°C ou en dessous.
- Après décongélation, le conjugué et les contrôles restent stables pendant 90 jours s'ils sont conservés entre +2°C et +8°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.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

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

Tous les sérums d'origine humaine utilisés dans ce coffret ont été testés à l'aide de techniques approuvées par la F.D.A. et déclarés négatifs en anticorps anti-VIH, anti-VHC ainsi qu'en antigène HBs. Néanmoins, comme aucune méthode ne peut garantir une innocuité totale, il est vivement recommandé de manipuler tous les échantillons (réactifs et spécimens) comme s'ils étaient potentiellement infectieux.

Ne jamais pipeter à la bouche.

Le conjugué, les contrôles et le milieu de montage contiennent de l'azide de sodium (< 0.1%) comme agent conservateur. Cette substance est toxique en cas d'ingestion. L'élimination des

composants contenant de l'azide de sodium peut provoquer la formation d'azides métalliques explosifs avec les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

Toute substitution de réactifs du coffret par d'autres peut entraîner des variations de résultats.

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

Un temps de lavage non respecté peut augmenter le bruit de fond ou altérer les cellules.

Ne pas utiliser de feutres ou marqueurs pour identifier les lames afin d'éviter d'éventuels aspects parasites.

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

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

PREPARATION DES REACTIFS

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. Pour les titrations, procéder à des dilutions de raison 2 : ex 1/20, 1/40 ...
- Agiter au vortex

MODE OPERATOIRE

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 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.
- 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 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 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.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Réaction négative :

Absence de fluorescence au niveau de l'endomysium de l'œsophage substrat. Les échantillons peuvent présenter une fluorescence due à un bruit de fond ou à une réaction d'interférence avec des anticorps anti-nucléaires ou anti-muscles lisses.

Réaction positive :

Présence d'une fluorescence nette verte pomme de l'endomysium ou des composants de réticuline des fibres de muscles lisses sur l'œsophage distal substrat.

CONTROLE DE QUALITE

Les contrôles positifs et négatifs, fournis dans chaque trousse, doivent être inclus à chaque série test.

Le contrôle Négatif ne produit aucune fluorescence de l'endomysium sur l'œsophage distal.

Le contrôle Positif AEmA (anticorps anti-endomysium) produit une fluorescence vert pomme de l'endomysium ou des composants de réticuline des fibres de muscles lisses de l'œsophage substrat avec une intensité minimum de 2+ ou plus.

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 PROCEDURE

Le coffret **Endomysium (AEmA)** est une aide précieuse au diagnostic. Cependant, il ne peut être utilisé seul pour poser le diagnostic. Tous les tests doivent être interprétés par un spécialiste en fonction de l'historique du patient.

Des interférences dues à d'autres auto-anticorps tels que les anticorps anti-nucléaires (ANA) ou anti-muscles lisses (ASMA) peuvent entraîner une réaction au niveau des couches musculaires de l'œsophage distal substrat.

La concentration en anticorps endomysiaux de classe IgA diminue avec le temps, quand les patients suivent un régime sans gluten.

Une réactivité faible, voire négative peut être observée sur un faible pourcentage de patients atteints de maladie coeliaque mais déficients en IgA. Une recherche d'anticorps endomysiaux de classe IgG et/ou d'anticorps anti-gliadine de classe IgG et IgA s'avère alors appropriée et bénéfique.

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.

VALEURS ATTENDUES

Les anticorps anti-endomysium sont présents chez presque 100 % des patients atteints de maladie coeliaque, 70 % des patients atteints de dermatite herpétiforme, et chez environ 20 % des patients présentant d'autres entéropathies^(3,4).

Il existe un faible pourcentage de patients ayant des anticorps anti-endomysium à IgG et négatifs en détection d'IgA. Un résultat négatif sur un patient présentant tous les symptômes cliniques doit orienter vers une recherche diagnostique d'IgG.

CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES

Sérums évalués avec le coffret Endomysium (AEmA) :

- sérums de patients dont les troubles diagnostiqués permettaient d'envisager des taux significatifs en anticorps anti-endomysium,
- sérums de patients ne présentant aucun symptôme de maladie coeliaque et de dermatite herpétiforme,
- sérums d'adultes en bonne santé sans problèmes médicaux.

La **sensibilité** du coffret **Endomysium (AEmA)** a été estimée à **95%** dans la population de patients atteints de maladie coeliaque (intervalle de valeurs rapporté dans la littérature : 90%-100%).

La **sensibilité** du coffret **Endomysium (AEmA)** a été estimée à **64%** dans la population de patients atteints de dermatite herpétiforme (intervalle de valeurs rapporté dans la littérature : 60%-70%).

La **spécificité** du coffret **Endomysium (AEmA)** a été estimée entre **97% et 99%** dans la population de patients atteints d'autres maladies auto-immunes (moyenne de valeurs rapportée dans la littérature : 98%).

La **spécificité** du coffret **Endomysium (AEmA)** a été estimée à **98%** dans le groupe contrôle (moyenne de valeurs rapportée dans la littérature : 98%).

Les études de comparaison menées entre le coffret Endomysium ^{bmd} et le réactif de référence ont révélé une concordance quasi-totale entre les deux techniques avec des performances comparables en terme de sensibilité, spécificité et reproductibilité sur les échantillons testés.

Les résultats obtenus lors de cette évaluation sur sérums humains de spécificités différentes montrent que le coffret ^{bmd} Endomysium (AEmA) présente une sensibilité et une spécificité très élevées pour la détection des anticorps anti-endomysium, et donc est une aide particulièrement fiable au diagnostic de la maladie coeliaque et des pathologies associées. Les résultats confirment également que la trousse est en concordance avec les statistiques sur les fréquences des résultats positifs et négatifs rapportées dans la littérature scientifique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, Leonard J, Krasny S : Sensitivity and specificity of IgA-class anti-endomysial antibodies for dermatitis herpetiformis and findings relevant to their pathogenic significance. Journal of the American Academy of Dermatology, Vol 15, N°3, p 464 (1986).
2. Kapuscinska A, Zalewski T, Chorzelski T, Sulej J, Beutner EH, Kumar V, Rossi T: Disease specificity, sensitivity and dynamics of changes in IgA class anti-endomysial antibodies in celiac disease. J Pediatric Gastroenterol Nutr, Vol 6, N°4, p529 (1987).
3. Blazer S, Naveh Y, Berant M et al. : Serum IgG antibodies to gliadin in children with celiac disease as measured by an immunofluorescence method. J Pediatric Gastroenterol Nutr, Vol 3, p205 (1984).
4. Chorzelski TP, Beutner EH, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonski S, Kumar V, Kapuscinska A : IgA anti-endomysium antibody. A new immunological marker for herpetiformis and coeliac disease. British Journal of Dermatology Vol 111, p 395 (1984).
5. Leonard JN, Haffenden GP, Fry L : Dermatitis herpetiformis in “ Immunopathology of the skin ”, Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V. Eds, John Wiley and Sons , New York, 3rd Ed. p 433 (1987).
6. Weinstein WM : Latent celiac sprue. Gastroenterology , Vol 66 N° 4, p 489 (1974).
7. Unsworth DJ, Leonard JN, Fry L : Anti-reticulin and anti-gliadin antibodies in dermatitis herpetiformis and celiac disease. “ Immunopathology of the skin ”, Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V. Eds, John Wiley and Sons , New York, 3rd Ed. p 455 (1987).
8. Volta U, Molinario N, Fusconi M et al. IgA anti-endomysial antibody test a step forward in celiac disease screening, Diag. Disease and Sci. Vol 36, N°6, 1991.
9. Kumar V, Jarzabek-Chorzelska M, Sulej J, Rajadhyaksha M., and Jablonska S : Tissue transglutaminase and endomysial antibodies - Diagnostic markers of gluten-sensitive enteropathy in dermatitis herpetiformis, Clinical Immunology, Vol 98, N°3, p378-382 (2001).
10. Johanet C. Marqueurs sérologiques de la maladie coeliaque. Spectra Biologie, Vol 17, N°99 (1998).
11. Ghedira I; et al. : Intérêt des anticorps anti-endomysium, anti-réticuline et anti-gliadine dans le diagnostic de la maladie coeliaque chez l'adulte. Ann Biol Clin, 57 : 717-9 (1999).















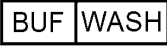

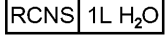
SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	QUANTITE A 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	⇒ 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 CONJUGUE	1 goutte par puits	immunoglobulines de chèvre anti-IgA humaines marquées à la fluoresceine (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 (x 10 - x 25 - x 40)		

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

T.A : Température Ambiante

LEGENDE 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 avec n puits		Contrôle négatif		Milieu de montage
	Conjugué immunofluorescent		Contrôle positif		Solution de lavage
	Test en immunofluorescence indirecte				A reconstituer avec 1L d'eau distillée

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



Endomysium (AEmA) IF

REF

ME 0648 ESD Coffret



ME 0604 ESD Substrat slide (4 puits)

ME 0696 ESD Coffret



ME 0608 ESD Substrat slide (8 puits)

INTENDED USE

The **Endomysium (AEmA)** kit is an indirect Immunofluorescence test used for the qualitative and semi-quantitative detection of IgA class endomysial autoantibodies in human serum as an aid in the diagnosis of Celiac Disease and other related disorders such as Dermatitis Herpetiformis.

DIAGNOSTIC VALUE

Celiac Disease (CD), considered to be an autoimmune disease, is a common gastrointestinal disorder, primarily of children, which is induced by gluten. Virtually all active cases of CD and 70% of a related disorder the dermatitis herpetiformis ⁽¹⁾ exhibit anti-endomysial antibodies of the IgA class. In most CD patients, the symptoms and anti-endomysial antibody titers decline once patients are put on a gluten-free diet ⁽³⁾. Thus, the detection of anti-endomysial antibodies can be used for the diagnosis of CD and for monitoring of the disease process ^(10,11).

Dermatitis Herpetiformis is an intensely pruritic vesicular skin disease characterized clinically by urticarial lesions and blisters. Any part may be involved but the lesions are usually distributed symmetrically over the elbows, knees, upper back and buttocks ^(5,6,9).

Celiac Disease entails intolerance to wheat, barley, rye and oat protein (gluten and its fractions), resulting in severe structural damages to the small intestine mucosa. The incidence of celiac disease is considered to range between 1/300 and 1/6500. A definitive diagnosis usually demands repeated intestinal biopsies, a controlled diet and follow up over a prolonged period ⁽²⁾.

PRINCIPLE OF THE TEST

Anti-endomysial antibodies, exhibiting some organ and species specificity ⁽³⁾, are detected by indirect immunofluorescence on sections of primate oesophagus (distal), where they react with the endomysium or the reticulin components of the smooth muscle filaments.

First:

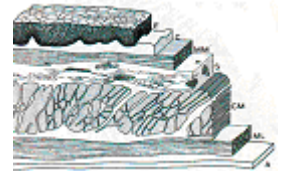
Sections of monkey oesophagus distal on microscope slides are overlaid with diluted patient's serum and incubated to allow the anti-endomysial antibodies – present in positive sera – to bind to the antigen sites in the oesophagus tissue.

Second:

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



This microphotography shows in a stronger magnification the typical pattern of esophagus in longitudinal section.



- E :** Stratified squamous epithelium
- C :** Chorion
- MM :** Muscularis mucosae
- S :** Submucosa
- CM :** Muscularis : circular layer
- ML :** Longitudinal muscularis
- A :** Adventitia

COMPONENTS

	ME 1248	ME 1296
Endomysium Substrate slides (monkey esophagus distal sections in multiple well-slides) SORB SLD n	12 x 4 wells	12 x 8 wells
Anti-IgA conjugate Fluorescently labelled anti-human IgA globulin in phosphate buffered saline (PBS) with 1% bovine serum albumin. Ready to use CONJ DTAF IgA	1 x 3 mL	1 x 2 mL + 1 x 3 mL
Positive control anti-endomysial (AEmA) Dropper vial containing positive patient sample producing a characteristic fluorescent pattern in the endomysium Ready to use CONTROL AEmA	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
Negative Control Dropper vial containing negative patient sample producing no fluorescent staining of the endomysium of oesophagus substrate. Ready to use CONTROL -	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
Phosphate buffered saline (PBS) Each PBS Powder pouch contains sufficient buffer powder to make 1 liter (10g/pouch). BUF WASH RCNS 1L H ₂ O To dilute	2 pouches	2 pouches
Mounting Medium Dropper vial containing buffered glycerol. Ready to use MM	3 mL	3 mL
Blotters for drying the substrate slides around the wells.	12	12

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

REAGENTS AVAILABLE INDIVIDUALLY

ME 0604 ESD	Endomysium Slide of 4 wells
ME 0608 ESD	Endomysium Slide of 8 wells
ME 0904	Anti-IgA conjugate (2 mL)
ME 0062 ESD	Positive Control anti-endomysial AEmA (0,5mL)
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)


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.

STABILITY AND STORAGE

- Expiration dates for substrates (slides), conjugate and controls are given for storage at -20°C or below.
- Once thawed the conjugate and controls are stable for 90 days when stored at +2° to +8°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  Test Kit components are for in vitro diagnostic use ONLY.

All human serum components have been tested by FDA approved method and found negative for antibody to HIV, HCV and non-reactive for HBsAg. However, no test method can offer complete assurance of the absence of these antigens. Care should be exercised when handling ALL human sera containing specimens.

Avoid mouth pipetting.

All controls, conjugate and mounting medium contain sodium azide as preservative in concentration 1:1,000. This preservative is toxic if ingested. In addition, sodium azide may react with lead or copper plumbing to form explosive azides.

On disposal of sodium azide containing solutions, flush with a large volume of water to prevent azide build-up.

Do not substituted others reagent's manufacturers.

Do not use components or reagents beyond their expiration dates. Extended incubation during the wash step or improper washing may result in poor morphology of substrate and increased background fluorescence.

Avoid using pen to identify the slide.

Remove slides from freezer and allow them to reach room temperature – **Don't remove from protective envelopes before use.**

Use each slide immediately after opening the envelope to avoid damaging the substrate by drying.

All reagents must be at room temperature before use (at least 15 mn).

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. 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 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 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 (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

Negative reaction

Produces no fluorescence staining of the endomysium of the oesophagus distal substrate. Samples may produce background staining or other reaction due to anti-nuclear or anti-smooth muscle antibodies interference.

Positive reaction

Produces an apple green fluorescence staining of the endomysium or the reticulin components of the smooth muscle filaments of the distal oesophagus substrate.

QUALITY CONTROL

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

The negative control should produce no fluorescence staining on the endomysium of oesophagus distal substrate.

Anti-Endomysial antibody (AEmA) positive control should result in an apple green fluorescence staining of the endomysium or the reticulin components of the smooth muscle filaments of distal oesophagus substrate at a fluorescence value of 2+ or higher.

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

The **Endomysium (AEmA)** test kit 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.

Interference or other auto-antibodies such as anti-nuclear antibodies (ANA) and anti-smooth muscle antibodies (ASMA) may result in the reaction of the muscle layers of distal oesophagus substrate. [bmd](#) offers Multiple Antibody Test Kit to further evaluate the presence and titre of these antibodies.

IgA endomysial antibody titer decreases with time, when patients are put on gluten free diet.

Weak or negative reactions to IgA class endomysial antibodies may be exhibited by a small percentage of celiac patients who are IgA deficient. Testing for IgG class endomysial and or IgG and IgA gliadin antibodies may be beneficial.

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 to be considered for IgG testing.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Serums of patients tested with the Endomysium (AEmA) [bmd](#) kit:


- patients whose diagnosed disorders are compatible with high rate of anti-endomysium antibodies,
- patients with no symptom of coeliac disease and dermatitis herpetiformis,
- healthy adults


The **sensitivity** of the **Endomysium (AEmA)** [bmd](#) kit was estimated at **95%** in the population of patients with coeliac disease (interval of values reported in the literature: 90%-100%).

The **sensitivity** of the **Endomysium (AEmA)** [bmd](#) kit was estimated at **64%** in the population of patients with dermatitis herpetiformis (interval of values reported in the literature: 60%-70%).

The **specificity** of the **Endomysium (AEmA)** [bmd](#) kit was estimated between **97% and 99%** in the population of patients with other autoimmune diseases (mean of values reported in the literature: 98%).

The **specificity** of the **Endomysium (AEmA)** [bmd](#) kit was estimated at **98%** in the control group (mean of values reported in the literature: 98%).

The comparative studies between Endomysium (AEmA)  kit and the kit of reference showed almost all agreement between the two techniques with comparable performances for sensitivity, specificity and reproducibility on the population tested.

The results of this evaluation on human serums of different specificities show that the **Endomysium (AEmA) ** kit has very high sensitivity and specificity for detection of the anti-endomysium antibodies, and thus it is useful to the diagnosis of the coeliac disease and associated pathologies. The evaluation confirm that the kit is in agreement frequencies of positive and negative results from the scientific literature.

BIBLIOGRAPHY

1. Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, Leonard J, Krasny S : Sensitivity and specificity of IgA-class anti-endomysial antibodies for dermatitis herpetiformis and findings relevant to their pathogenic significance. *Journal of the American Academy of Dermatology*, Vol 15, N°3, p 464 (1986).
2. Kapuscinska A, Zalewski T, Chorzelski T, Sulej J, Beutner EH, Kumar V, Rossi T: Disease specificity, sensitivity and dynamics of changes in IgA class anti-endomysial antibodies in celiac disease. *J Pediatric Gastroenterol Nutr*, Vol 6, N°4, p529 (1987).
3. Blazer S, Naveh Y, Berant M et al. : Serum IgG antibodies to gliadin in children with celiac disease as measured by an immunofluorescence method. *J Pediatric Gastroenterol Nutr*, Vol 3, p205 (1984).
4. Chorzelski TP, Beutner EH, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonski S, Kumar V, Kapuscinska A : IgA anti-endomysium antibody. A new immunological marker for herpetiformis and coeliac disease. *British Journal of Dermatology* Vol 111, p 395 (1984).
5. Leonard JN, Haffenden GP, Fry L : Dermatitis herpetiformis in “ Immunopathology of the skin ”, Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V. Eds, John Wiley and Sons , New York, 3rd Ed. p 433 (1987).
6. Weinstein WM : Latent celiac sprue. *Gastroenterology* , Vol 66 N° 4, p 489 (1974).
7. Unsworth DJ, Leonard JN, Fry L : Anti-reticulín and anti-gliadin antibodies in dermatitis herpetiformis and celiac disease. “ Immunopathology of the skin ”, Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V. Eds, John Wiley and Sons , New York, 3rd Ed. p 455 (1987).
8. Volta U, Molinaro N, Fusconi M et al. IgA anti-endomysial antibody test a step forward in celiac disease screening. *Diag. Disease and Sci.* Vol 36, N°6, 1991.
9. Kumar V, Jarzabek-Chorzelska M, Sulej J, Rajadhyaksha M., and Jablonska S : Tissue transglutaminase and endomysial antibodies - Diagnostic markers of gluten-sensitive enteropathy in dermatitis herpetiformis, *Clinical Immunology*, Vol 98, N°3, p378-382 (2001).
10. Johanet C. Marqueurs sérologiques de la maladie coeliaque. *Spectra Biologie*, Vol 17, N°99 (1998).
11. Ghedira I; et al. : Intérêt des anticorps anti-endomysium, anti-réticuline et anti-gliadine dans le diagnostic de la maladie coeliaque chez l'adulte. *Ann Biol Clin*, 57 : 717-9 (1999).










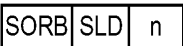






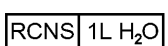
SUMMARY OF METHOD

	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 Goat anti-human IgA (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 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 with "n" wells		Negative control		Mounting Medium
	Fluorescent antibody conjugate		Positive control		Wash Buffer
	Immunofluorescent assay				Reconstitute with 1L distilled water

BioMedical 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

