

Anti-Peau (ASA) IF – Coupes d'œsophage de singe

REF

ME 0748 ES

Coffret

48

DÉFINITION

Le coffret **Anti-peau (IF) - Œsophage de singe** est un test d'immunofluorescence indirecte destiné à la détection qualitative et semi-quantitative des auto-anticorps anti-peau sur coupe d'œsophage de primate dans le sérum ⁽²⁾⁽⁶⁾⁽¹⁰⁾⁽¹³⁾. Ce test contribue à l'établissement du diagnostic des maladies bulleuses de peau tel que les pemphigus ou les pemphigoïdes.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les lésions de la peau sont retrouvées dans de nombreuses maladies systémiques ⁽³⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹²⁾. Parmi les maladies auto-immunes de la peau, on peut distinguer les pemphigus, la pemphigoïde cicatricielle, la dermatite herpétiforme, la dermatose bulleuse.

Les **pemphigus** sont des maladies bulleuses intra épidermiques qui existent sous différentes formes dont la plus fréquente est le pemphigus vulgaire. Il touche principalement les individus âgés de 40 à 60 ans. Les lésions primitives sont des vésicules ou des lésions intra-épidermiques, fragiles, flasques, larges, se rompant très facilement laissant place à des zones érodées qui vont se recouvrir de croûtes. Elles siègent avec prédilection sur le cuir chevelu, le visage, le tronc et les muqueuses ⁽¹⁴⁾. Les auto-anticorps circulants réagissent avec la substance intercellulaire au niveau de l'épithélium pavimenteux stratifié et sont détectés chez 80 à 90% des patients ⁽⁵⁾.

La **pemphigoïde bulleuse** est une maladie bulleuse sous-épidermique. Elle est beaucoup plus fréquente que le pemphigus et survient surtout chez les personnes âgées. Les zones de prédilection se situent sur l'abdomen, la région générale et les faces d'extension des jambes ⁽¹⁴⁾. Les auto-anticorps circulants réagissent avec la membrane basale présente à jonction dermo-épidermique et sont détectés chez environ 70% des patients ⁽¹⁾⁽⁵⁾⁽¹⁰⁾. Ces auto-anticorps circulants réagissent avec l'épithélium de l'œsophage de primate, ils ne sont pas observés dans d'autres dermatoses, donnant à ces anticorps leur valeur diagnostique ⁽⁴⁾. Ces auto-anticorps sont principalement de classe IgG. Il y a généralement une relation entre le titre et l'activité de la maladie.



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



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

PRINCIPE DU TEST

La biopsie et l'étude du sérum sont 2 éléments critiques pour le diagnostic. Le coffret **Anti-peau (IF) - Œsophage de singe** est une technique en immunofluorescence indirecte.

Étape N°1 :

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

Étape N°2 :

Les sites de réactivité ayant fixé les anticorps anti-peau 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 comme typique et caractéristique de chaque auto-anticorps.

COMPOSITION DES COFFRETS

	ME 0748 ES
Lames de substrat (Œsophage de singe) (Coupes d'œsophage de singe sur des lames à puits multiples) SORB SLD 4	12 x 4 puits
Conjugué anti-IgG Flacon contenant des immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines (chaînes lourdes et légères) couplée à la fluorescéine (DTAF), avec 1% de BSA et bleu Evans. CONJ DTAF IgG Prêt à l'emploi.	1 x 2 ml
Contrôle Positif anti-substance intercellulaire Sérum positif produisant une image de fluorescence, caractérisant une réaction de substance intercellulaire (ASA-Pemphigus), par l'utilisation d'une technique d'immunofluorescence indirecte. Prêt à l'emploi CONTROL ICS	1 x 0,5 ml
Contrôle Négatif Sérum négatif ne produisant aucune fluorescence caractéristique. Prêt à l'emploi CONTROL -	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 A reconstituer BUF WASH RCNS 1L H ₂ O	2 sachets
Milieu de Montage Flacon compte-gouttes de glycérol dilué. Prêt à l'emploi MM	3 ml
Buvards pour essuyer autour des puits	12

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

RÉACTIFS DISPONIBLES INDIVIDUELLEMENT

ME 0063 ES	Contrôle positif anti-substance intercellulaire ASA-Pemphigus (0,5 ml)
ME 0062 ES	Contrôle positif anti-membrane basale ASA-Pemphigoïde (0,5 ml)
ME 902.2	Conjugué fluorescent anti-IgG (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)

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.

STABILITÉ 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 60 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.

PRÉCAUTIONS 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, le contrôle 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.

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
Pour les titrations, procéder à des dilutions de raison 2 :
ex 1/20, 1/40 ...
- 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.
- Éliminer le sérum d'un geste sec au dessus d'une poubelle pour éviter les contaminations.
- 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 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.

Une **fluorescence spécifique de la substance intercellulaire** correspond à un **test positif** pour la présence d'auto-anticorps **du pemphigus**.

Une **fluorescence spécifique au niveau de la membrane basale** correspond à un **test positif** pour la présence d'auto-anticorps **de la pemphigoïde bulleuse**.

Anticorps Recherchés	Seuil de positivité
Anti-substance intercellulaire	> 1/10
Anti-membrane basale	> 1/10

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les contrôles positifs et négatifs, fournis dans chaque trousse, 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

Le coffret **Anti-peau (IF) - Œsophage de singe** est une aide précieuse au diagnostic. Cependant, il ne peut être utilisé seul pour poser le diagnostic. Tous les tests doivent être interprétés par une autorité médicale qui tiendra compte de l'historique du patient.

CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES

Analyses :

Les lames d'Immunofluorescence indirecte (IFI) ont été analysées en utilisant les unités arbitraires admises pour l'intensité en microscopie de fluorescence. Les unités en décroissance d'intensité sont : 4+, 3+, 2+, 1+, +/-, -.

Reproductibilité du titre :

Quatre échantillons de sérum ont été examinés sur trois lots différents avec les coffrets **bmd** en trois manipulations différentes. Toutes les valeurs positives ont été retrouvées à la même dilution finale pour chacune des trois répliques.

Echantillons normaux :

Des sérums de 743 donneurs de sang en bonne santé sans maladie auto-immune connue ont été examinés avec le coffret **bmd Skin (IF)**. Les sérums ont été dilués au 1:20. Les sérums dont la lecture au 1:20 était négative, ont été considérés comme négatifs. Les sérums dilués au 1:20 (présentant une intensité de lecture de 1+ ou plus) ont été identifiés comme positifs. Les valeurs obtenues sont énoncées dans le tableau ci-dessous, elles indiquent le pourcentage de sérums de patients sains testés et considérés positifs.

Sérums des patients présentant des désordres immunologiques diagnostiqués :

Des sérums de 1019 patients présentant plusieurs types de désordres immunologiques diagnostiqués ont été testés avec le coffret **bmd Anti-peau (IF) - Œsophage de singe**. Les sérums ont été dilués du 1:10 au 1:320. Les valeurs observées et attendues des sérums sont indiquées dans les tableaux ci-après.

Pourcentage (%) observé de sérums considérés comme positive	
<i>Pemphigoid, bullous</i>	68
<i>Pemphigus vulgaris</i>	87
Patients sains	4

Pourcentage (%) attendu de sérums considérés comme positive	
<i>Pemphigoid, bullous</i>	70
<i>Pemphigus vulgaris</i>	85
Patients sains	2

BIBLIOGRAPHIE

1. Bean SF, et al
Cicatrical pemphigoid, immunofluorescent studies. Arch Dermatol 106,195 (1972)
2. Beutner EH, Jordon RE
Immunofluorescence staining. Proc Soc Exp Biol Med 117, 505 (1964)
3. Beutner EH, et al
Immunopathology of skin. Churchill
4. Chorzelski TP, et al
Clinical significance of autoantibodies in pemphigus. Arch Dermatol 93,570 (1966)
5. Chorzelski T, et al
Autoantibodies in pemphigoid. Dermatologica 136,325 (1968)
6. Cooperative Study
Uses of immunofluorescence tests of skin and sera. Arch Dermatol 111, 371 (1975)
7. Fellner MJ
Immunology of skin diseases. Elsevier, New York, 1980
8. Fry L, Seah PP
Immunological aspects of skin diseases. John Wiley & Sons, New York, 1974
9. Hodge L, et al
Bullous pemphigoid : The frequency of mucosal involvement and concurrent malignancy related to indirect immunofluorescence findings. Brit J Dermatol 105,65 (1981)
10. Nishikawa T, et al
Binding of bullous pemphigoid antibodies to basal cells. J Invest Dermatol 74,389 (1975)
11. Tufanelli DL
Cutaneous immunopathology : Recent Observations. J Invest Dermatol 65,143 (1975)
12. Valenzuela R, Bergfeld WF, Deodhar SD
The interpretation of immunofluorescence patterns in skin disease. Amer Soc Clin Pathol Press, Chicago, 1984
13. Richard C ; Joly P (1999)
Anticorps anti-peau et maladies bulleuses auto-immune - Autoanticorps marqueurs de maladies auto-immune. [bnd](#) Editions p.349.
14. Humbel RL (1994)
Maladies auto-immunes de la peau – Auto-anticorps et maladies auto-immunes Editions Option Bio Elsevier version N°1 – p.211.










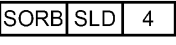
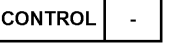


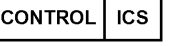
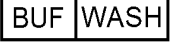

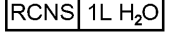
SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	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	⇒ 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	immunoglobulines de chèvre anti-IgG 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

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

BioMedical 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-Skin (ASA) IF – Monkey esophagus sections

REF

ME 0748 ES

Coffret



INTENDED USE

The **Anti-Skin (IF) – Monkey esophagus** kit is an indirect Immunofluorescence test used for the qualitative and semi-quantitative detection of skin disease's auto-antibodies using microtome sections of the monkey oesophagus as substrate in human serum ^(2,6,10,13). This test is a particular value as an aid in the diagnosis and management of patients with one of the above-mentioned skin diseases, i.e. pemphigus vulgaris or bullous pemphigoid.

DIAGNOSTIC VALUE

Skin lesions may reflect a wide variety of systemic diseases ^(3, 7, 8, 9, 12). The skin diseases with a primary immune disorders of the pathogenesis are referred to as autoimmune disorders of the skin and include pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid.

Pemphigus vulgaris is a blistering disorder of the skin and mucous membranes affecting mostly individuals between 40 and 60 years of age. Circulating pemphigus antibodies, reacting with the intercellular membranes of the epithelial substrate, can be detected in 80% to 90% of the patients ⁽⁵⁾.

Bullous pemphigoid is a chronic bullous disorder of the elderly. Circulating pemphigoid antibodies, reacting with the basement membrane of the squamous epithelial cell layer, can be found in approximately 70% of the patients ^(1,5,10). Circulating serum antibodies reacting with epithelial tissues, are not seen in other vesiculo-bullous dermatoses. Detection of circulating antibodies is therefore valuable in the differential diagnosis of these disorders ⁽⁴⁾.

The circulating antibodies in both of the above mentioned autoimmune disorders have been shown to belong, principally, to the IgG class. There is a positive relationship between the antibody titer and the disease activity.



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

PRINCIPLE OF THE TEST

Both biopsy and serum studies are of critical value in the diagnosis. The **Anti-Skin (IF) – Monkey esophagus** kit is an immunofluorescence test.

First:

The substrate sections of monkey oesophagus on microscope slides are overlaid with diluted patient's serum and incubated to allow the anti-skin (anti-epidermal) antibodies present in positive sera – to bind to the antigen sites in the oesophageal tissue.

Second:

Sites where the anti-skin interacted with the antigenic constituents of the substrate are made visible by binding to them 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 0748 ES
Monkey esophagus substrate slides (sections of monkey oesophagus in multiple well-slides) <div style="text-align: right;">SORB SLD 4</div>	12 x 4 wells
Anti-IgG conjugate Fluorescently labelled anti-human IgG globulin in phosphate buffered saline (PBS) with 1% bovine serum albumin and with evans blue. Ready to use <div style="text-align: right;">CONJ DTAF IgG</div>	1 x 2 mL
Positive control anti-intercellular substance Dropper vial containing positive patient sample exhibiting fluorescence pattern, characterizing intercellular substance reaction (ASA-Pemphigus), using immunofluorescence method. Ready to use <div style="text-align: right;">CONTROL ICS</div>	1 x 0,5 mL
Negative Control Dropper vial containing negative patient sample producing no fluorescence staining with the oesophagus substrate. Ready to use <div style="text-align: right;">CONTROL -</div>	1 x 0,5 mL
Phosphate buffered saline (PBS) Each PBS Powder pouch contains sufficient buffer powder to make 1 liter (10g/pouch). To dilute <div style="text-align: right;">BUF WASH RCNS 1L H₂O</div>	2 pouches
Mounting Medium Dropper vial containing buffered glycerol. Ready to use <div style="text-align: right;">MM</div>	3 mL
Blotters for drying the substrate slides around the wells.	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 0063 ES	Positive control anti-intercellular substance ASA-Pemphigus (0,5 mL)
ME 0062 ES	Positive control anti-basal membrane ASA-Pemphigoide (0,5 mL)
ME 902.2	Anti-IgG 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)

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 [Lmd](#) 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.
Ex : 20µL serum + 180 µL 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

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.

Specific staining of the intercellular substance between the squamous epithelial cells is considered a positive test for pemphigus antibodies.

Specific staining of the basement membrane is considered a positive test for bullous pemphigoid.

Auto-antibodies detected	Cut off
Intercellular membranes	> 1/10
Basement membrane	> 1/10

QUALITY CONTROL

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Assay units:

Indirect immunofluorescence (IIF) was assayed using accepted arbitrary units of intensity under fluorescence microscopy. The units from greatest to least intensity are; 4+, 3+, 2+, 1+, +/-, -.

Titer reproducibility:

Four serum samples were tested on three different lot numbers of bmd kits on three different occasions. All positive values titred to negative at the same dilution for each of the three replicates.

Normal samples:

Sera from 743 healthy blood donors with no history of autoimmune disease were tested on bmd **Anti-Skin (IF) – Monkey esophagus** kits. Sera were diluted 1:20. A negative reading at 1:20 was considered negative. Positive readings of 1+ or higher at dilutions of 1:20 or greater were scored as positive. These data are reported in the table below as the observed percent of sera tested that scored as positive for healthy subjects.

Sera from patients with diagnosed disorders:

Sera from 1019 patients with variety of diagnosed disorders were tested with bmd **Anti-Skin (IF) – Monkey esophagus** kits. Sera were diluted from 1:10 to 1:320. The observed and expected values of sera are notices in the hereafter tables.

<i>Observed percent (%) of sera scored as positive</i>	
<i>Pemphigoid, bullous</i>	68
<i>Pemphigus vulgaris</i>	87
Healthy subjects	4

<i>Expected percent (%) of sera scored as positive</i>	
<i>Pemphigoid, bullous</i>	70
<i>Pemphigus vulgaris</i>	85
Healthy subjects	2

BIBLIOGRAPHY

1. Bean SF, et al
Cicatrical pemphigoid, immunofluorescent studies. Arch Dermatol 106,195 (1972)
2. Beutner EH, Jordon RE
Immunofluorescence staining. Proc Soc Exp Biol Med 117, 505 (1964)
3. Beutner EH, et al
Immunopathology of skin. Churchill
4. Chorzelski TP, et al
Clinical significance of autoantibodies in pemphigus. Arch Dermatol 93,570 (1966)
5. Chorzelski T, et al
Autoantibodies in pemphigoid. Dermatologica 136,325 (1968)
6. Cooperative Study
Uses of immunofluorescence tests of skin and sera. Arch Dermatol 111, 371 (1975)
7. Fellner MJ
Immunology of skin diseases. Elsevier, New York, 1980
8. Fry L, Seah PP
Immunological aspects of skin diseases. John Wiley & Sons, New York, 1974
9. Hodge L, et al
Bullous pemphigoid : The frequency of mucosal involvement and concurrent malignancy related to indirect immunofluorescence findings. Brit J Dermatol 105,65 (1981)
10. Nishikawa T, et al
Binding of bullous pemphigoid antibodies to basal cells. J Invest Dermatol 74,389 (1975)
11. Tufanelli DL
Cutaneous immunopathology : Recent Observations. J Invest Dermatol 65,143 (1975)
12. Valenzuela R, Bergfeld WF, Deodhar SD
The interpretation of immunofluorescence patterns in skin disease. Amer Soc Clin Pathol Press, Chicago, 1984
13. Richard C ; Joly P (1999)
Anticorps anti-peau et maladies bulleuses auto-immune - Autoanticorps marqueurs de maladies auto-immune. bmd Editions p.349.
14. Humbel RL (1994)
Maladies auto-immunes de la peau – Auto-anticorps et maladies auto-immunes Editions Option Bio Elsevier version N°1 – p.211.










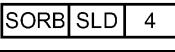




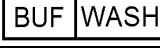

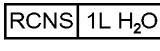
SUMMARY OF METHOD

	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 IgG (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 of 4 wells		Negative control		Mounting Medium
	Fluorescent antibody conjugate		Positive control		Wash Buffer
	Immunofluorescent assay				Reconstitute with 1L distilled water

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

