



# SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

## Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!  
See the following pages for more information!



### Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

### Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

### SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

[mail@szabo-scandic.com](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 



# Immulo™ Anti-Skin Antibody (IC/BMZ) Test System Monkey/Guinea Pig Esophagus Sections

For *in vitro* Diagnostic Use **IVD**

CLIA Complexity: High

CDC Analyte Identification Code: 0449

CDC Test System Identification Code: 28313

**REF** Code: 1104 48 determinations

## PRODUCT INSERT

### INTENDED USE

An indirect immunofluorescence antibody test for the detection and quantitation of anti-skin (anti-intercellular and anti-basement membrane) antibodies in human serum.

### SUMMARY AND EXPLANATION

The detection of anti-skin antibodies aids in the diagnosis, and sometimes prognosis, of chronic vesicular-bullous diseases including pemphigus, pemphigoid, cicatricial pemphigoid, and epidermolysis bullosa acquisita (EBA)<sup>1</sup>. Epithelial intercellular antibodies are diagnostic for pemphigus and occur in over 90% of sera from all active forms<sup>2</sup>. Because of the species specificity of IC antibodies, the use of the dual monkey/guinea pig esophagus substrates further distinguishes the intercellular antibodies of pemphigus vulgaris and vegetans, which preferentially react with monkey esophagus sections, from the antibodies of pemphigus foliaceus and erythematosus which react more strongly with guinea pig esophagus sections<sup>3,6</sup>. Antibodies to basement membrane antigens of stratified squamous epithelium occur in about 70% of active bullous pemphigoid, 50% of vesicular pemphigoid and EBA and 10% of cicatricial pemphigoid patients. The basement membrane antibodies usually react with both monkey esophagus and guinea pig esophagus sections<sup>3,6</sup>.

### PRINCIPLES OF PROCEDURE

In the indirect immunofluorescence method used in this kit, patients' sera are incubated on monkey/guinea pig esophagus sections to allow binding of antibodies to the substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of these sections with fluorescein-labeled, anti-human IgG. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters.

The presence of anti-intercellular and anti-basement membrane antibodies is demonstrated by an apple green fluorescence of these respective histologic structures. The titer (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) is then determined by testing serial dilutions<sup>2</sup>.

### PRODUCT INFORMATION

#### Storage and preparation

Store all reagents at 2-8°C. Reagents are ready for use after equilibration to room temperature.

#### Materials provided

**REF** Code: 1104 48 determinations

8 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>6</b>	6 well Substrate Slides, Monkey/Guinea Pig Esophagus
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>IC</b> *	Anti-IC Positive Control. Contains human serum.

## EN

1 x 0.5 ml	<b>CONTROL + BMZ</b> *	Anti-BMZ Positive Control. Contains human serum.
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC EB</b> *†	Anti-human FITC Conjugate containing Evan's Blue. Protect from light.
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Buffered Diluent.
2 vials	<b>BUF WASH</b>	Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5 ml	<b>MOUNTING MEDIUM</b> *	Mounting Medium. Do not freeze.
1 x 12	<b>COVER SLD</b>	Coverslips.

### Optional Components

1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC PA</b> *	<b>REF</b> 2099. Anti-human IgG FITC Conjugate (primate adsorbed). Protect from light. Reduces background fluorescence on primate substrate.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC</b> *	<b>REF</b> 2100X. Anti-human IgG FITC Conjugate. Protect from light.
1 x 1 ml	<b>EVANS</b> *	<b>REF</b> 2510. Anti-human IgG FITC Conjugate. Protect from light.

\* Contains < 0.1% NaN<sub>3</sub>

† Replaces conjugate without counterstain in Code numbers containing "EB"

### Material required but not provided

- Fluorescence microscope
- Micropipette or Pasteur pipette
- Serological pipettes
- Staining dish (e.g. Coplin jar)
- Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack
- Distilled or deionized water
- 1 liter container
- Wash bottle
- Paper towels
- Incubation chamber

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HbsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regard-less of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>7</sup>.

WARNING – Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup.

Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from IMMCO. Do not use beyond expiration date.

## SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

## PROCEDURE

### Test Method

#### A. Screening

1. Dilute each patient serum 1:10 with the Buffered Diluent (10 µl serum + 90 µl Diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for 10-15 minutes. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of Positive Control to well #2. Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash 10 minutes. Repeat process with all remaining slides.
8. Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the Conjugate dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) to each well.
9. Repeat steps **7 and 8** for each slide.
10. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate 30 minutes at room temperature.
11. Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for 10 minutes. If desired, 2-3 drops of Evans blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **3 drops** of Mounting Medium evenly on the coverslip and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.
14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.

15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.

Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed for up to 48 hours. Slides should be stored in the dark at 2-8°C.

### B. Endpoint Determination (titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following **Steps 5 through 13** to determine the titer. Each test run should include the one slide with the undiluted Negative Control and undiluted, 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16 dilutions of the Anti-Intercellular Positive Control. Make serial two-fold dilutions of the patient's serum starting at 1:10 (see following diagram). Using another slide, a serum positive for intercellular antibodies may be tested at dilutions ranging from 1:10 to 1:320. An additional slide should be used to obtain endpoints for those patients' sera still positive at a 1:320 dilution.

A serum positive for anti-basement membrane antibodies when screened at doubling dilutions of 1:10 through 1:80 may be reported as positive,  $\geq 80$ . If instead, a serum has been screened at 1:20 and 1:40, then prepare additional two fold dilutions of 1:80 to 1:640 and use an additional slide. Include the anti-basement membrane control in one well and the Negative Control in another well. **DO NOT** dilute these controls.

The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

### Preparation of Serial Dilutions

For sera positive for intercellular antibodies upon screening, number twelve tubes 1 through 12. Add 0.9 ml of buffered diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 12. Pipette 0.1 ml of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 0.2 ml from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 0.2 ml from one tube to the next after mixing to yield the dilutions depicted in the following table:

Tubes	1	2	3	4	5	6, etc
Serum	0.1 ml					
	+					
Buffered Diluent	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transfer		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Final dilution	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

For sera positive for basement membrane antibodies when tested at 1:20 and 1:40 dilutions, number seven tubes 1 through 7 and make dilutions as described above.

### Quality Control

Both the Positive and Negative Controls should be included with each test run. The Negative Control should show no specific fluorescence of the intercellular or basement membrane areas. The Anti-Intercellular Positive Control and the Anti-Basement Membrane Positive Control both should have 2+ or greater staining intensity of the epithelial intercellular and the basement membrane areas, respectively, on both substrates. Upon titration of the anti-intercellular positive control, an endpoint titer of  $8 \pm$  one doubling dilution should be obtained. Sample reactions are provided in Figures 1 and 2 at the end of this document.

If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control.
- Problems with the optical system of the fluorescence microscope. These may include: improper alignment, use of the bulb beyond the expected performance life, etc.

- Allowing the slide to dry during the procedure.
- Improper preparation of serial dilutions of controls.

## RESULTS

The results of the tests for anti-intercellular antibodies should be reported as negative (<10) or positive with titer. The results of the tests for anti-basement membrane antibodies should be reported as negative (<10), positive ( $\geq 80$  or  $\geq 640$ ) or alternatively, positive with titer. Read for specific staining of the epithelial intercellular substance or basement membrane zone. Various other tissue antibodies such as ANA, mitochondrial, smooth muscle, endomysial, basal cell cytoplasmic and upper cytoplasmic antibodies and antibodies to striated muscle may also be observed on monkey and guinea pig esophagus sections<sup>4</sup>. Sera giving any of these reactions should be reported as negative for antibodies to intercellular and to basement membrane antigens. Any sera giving nuclear staining reactions may be tested on Antinuclear Antibody (ANA) Test (HEP-2 Cells) *Catalog Nos. 1102 or 1103*, Antinuclear Antibody (ANA) Test (Mouse Liver Sections) *Catalog Nos. 1100 or 1101*. Any sera giving smooth muscle or mitochondrial staining reactions may be tested on Autoantibody Test System (Mouse Kidney/Stomach Sections) *Catalog No. 1107*.

## LIMITATION OF THE PROCEDURE

In some sera both intercellular and basement membrane antibodies may be present in varying titers as indicated by different staining patterns. Both antibody patterns and their titers should be reported. Occasionally sera may exhibit strong staining for ANA, antibodies to the cytoplasm, and non-specific staining of spinous or basal cell layer of epithelium. These may interfere with the ability to detect anti-intercellular and anti-basement membrane antibodies, respectively. In such cases titrating the serum may permit visualization of the skin antibodies. In other cases they may be in lower titer than the ANA or cytoplasmic antibodies.

In the latter situation, the serum should be reported as negative for intercellular and basement membrane antibodies, but it should be mentioned that skin antibodies cannot be excluded. In cases such as these, biopsy studies by direct immunofluorescence are recommended.

The goat anti-human IgG FITC Conjugate supplied in this kit is primarily heavy chain specific but has some light chain activity. It reacts primarily with IgG class autoantibodies, but may, to a lesser degree, react with light chains of other classes such as IgM.

A positive basement membrane antibody reaction with a linear pattern is consistent with a diagnosis of pemphigoid (i.e. bullous pemphigoid or other forms of pemphigoid) or of epidermolysis bullosa acquisita. The indirect immunofluorescence method using these substrates cannot distinguish between these two diseases.

A positive intercellular reaction is not diagnostic of pemphigus. Such reactions may also be due to blood group antibodies or pemphigus-like antibodies. It is recommended that all sera positive for intercellular antibodies be absorbed to distinguish those sera giving positive intercellular staining due to blood group antibodies<sup>3</sup>.

Therefore, clinicians need to consider the serum findings together with the clinical findings and other laboratory studies, notably histopathology and direct immunofluorescence of skin biopsy specimens, towards the diagnosis of pemphigus or pemphigoid.

## EXPECTED VALUES

Almost all pemphigus patients have IC antibodies. The use of the dual substrates increases the sensitivity of detecting intercellular antibodies as indicated by the data in Table 1 at the end of this document on 123 pemphigus patients.

In addition to increasing the sensitivity, the use of both tissue substrates enables the immunologic differentiation of pemphigus vulgaris from pemphigus foliaceus in most cases<sup>4-6</sup>. As illustrated in Table 2, pemphigus vulgaris sera generally give higher titers and/or brighter staining on monkey esophagus than on guinea pig esophagus, while the opposite is true for pemphigus foliaceus sera.

## EN

Comparison of titers of pemphigus antibodies in previous and current sera from patients with a proven diagnosis of pemphigus affords valuable prognostic information since the fluctuations in titer tend to parallel the disease activity as shown in Figure 4. Titers afford useful information for the adjustment of doses of therapeutic agents; patients with residual titers but no lesions may be expected to have relapses if therapy is withdrawn<sup>6</sup>.

The percentage of pemphigoid patients with anti-basement membrane antibodies varies with the form of the disease as shown by Table 3.

Differentiation of the antibodies of epidermolysis bullosa acquisita and pemphigoid requires special test procedures<sup>8-10</sup>. The recommended method is an indirect immunofluorescence test of basement membrane antibodies on normal skin split with 1M NaCl<sup>9</sup>. Titers of basement membrane antibodies usually do not parallel disease activity as do pemphigus antibodies.



# ImmuGlo™ TEST DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIPIEL (IC/BMZ)

IVD
-----

REF
-----

Code: 1104

48 determinations

Test de detección de inmunofluorescencia indirecta para la detección y cuantificación de los anticuerpos anti-piel (anti-intercelular (IC) y anti-basement membrana zona (BMZ) en suero humano.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La detección de las ayudas de los anticuerpos anti-piel en la diagnosis, y a veces pronóstico, de enfermedades vesicular-bullares crónicas incluyendo pemphigus, pemphigoid, pemphig-oid cicatricial, y el epidermolysis bullosa acquisita (EBA)<sup>1</sup>. Los anticuerpos intercelulares epiteliales son de diagnóstico para el pemphigus y ocurren adentro sobre el 90% de sueros de todas las formas activas<sup>2</sup>. Debido a la especificidad de la especie de los anticuerpos del IC, el uso de los substratos duales (mono/conejillo de Indias esófago) del más futuros distingue los anticuerpos intercelulares del pemphigus vulgaris y de vegetans, que reaccionan preferencial con las secciones del esófago del mono, de los anticuerpos del pemphigus foliaceus y del erythematousus que reaccionan más fuertemente con las secciones del esófago del conejillo de Indias<sup>3-6</sup>. Los anticuerpos a los antígenos de la basement membrana del epitelio squamous estratificado ocurren en el cerca de 70% de pemphigoid bullar activo, el 50% de pemphigoid vesicular y de EBA y el 10% de pacientes con pemphigoid cicatricial. Los anticuerpos de la BMZ reaccionan generalmente con las secciones del esófago del conejillo de Indias y del esófago del mono<sup>3-6</sup>.

## PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

En el método indirecto de la inmunofluorescencia usado en este kit, los sueros de los pacientes se incuban en secciones del esófago del primate/conejillo de Indias para permitir atar de anticuerpos al substrato. Cualquier anticuerpo no limitado es quitado aclarando. Los anticuerpos encuadrados de la clase IgG son detectados por la incubación de estas secciones con fluorescein-etiquetado contra-humano IgG. Reactions se observan debajo de un microscopio de la fluorescencia equipado de los filtros apropiados.

La presencia de los anticuerpos anti-IC y del anti-BMZ es demostrada por una fluorescencia verde de estas estructuras histologias respectivas. El título (el recíproco de la dilución más alta que da una reacción positiva) entonces es determinado probando las diluciones seriales<sup>2</sup>.

## INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

### Almacenamiento y preparación

Almacenar todos los reactivos a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos pueden emplearse después de haber sido equilibrados a temperatura ambiente.

### Materiales Suministrados

REF	Code: 1104	48 determinations
-----	------------	-------------------

8 x	SORB	SLD	6
-----	------	-----	---

**Portaobjetos de 6 pocillos**, esófago del primate/conejillo de Indias

1 x 0,5 ml	CONTROL	+	IC	*
------------	---------	---	----	---

A **Control positivo anti-IC**, suero humano

1 x 0,5 ml	CONTROL	+	BMZ	*
------------	---------	---	-----	---

**Control positivo anti-BMZ**, suero humano

1 x 0,5 ml	CONTROL	-	*
------------	---------	---	---

**Control negativo**, suero humano.



## ES

1 x 5 ml 

IgG-CONJ	FITC	EB
----------	------	----

 \*†

**Conjugado FITC anti-humana IgG con azul de Evans.**  
Proteger da luz.

1 x 60 ml 

BUF
-----

 \*

**Diluyente de la muestra.**

2 frascos 

BUF	WASH
-----	------

**Fosfato salino tamponado (PBS).** Disolver cada vial en 1 litro.

1 x 5 ml 

MOUNTING	MEDIUM
----------	--------

 \*

**Medio de preparación.** No congelar.

1 x 12 

COVER	SLD
-------	-----

**Cubreobjetos.**

### Materias opcionales comercializados

1 x 5 ml 

IgG-CONJ	FITC	PA
----------	------	----

 \*

**[REF]** 2099. Conjugado FITC anti-humana IgG (primate adsorbente). Proteger de la luz. Reduce fluorescencia del fondo en el sustrato del primate.

1 x 5 ml 

IgG-CONJ	FITC
----------	------

 \*

**[REF]** 2100X. Conjugado FITC anti-humana IgG. Proteger da luz.

1 x 1 ml 

EVANS
-------

 \*

**[REF]** 2510. Colorante de contraste azul Evans

\* PRECAUCIÓN - Contiene < 0,1% NaN<sub>3</sub>

† Substituye **Conjugado sin azul de Evans** en los números de código que contienen el "EB "

### Material necesario, pero no suministrado

- Microscopio de fluorescencia
- Micropipetas o pipeta Pasteur
- Pipetas serológicas
- Placa de tinción (por ejemplo, frasco de Coplin)
- Tubos de ensayo pequeños (por ejemplo, 13 x 75 mm) y gradilla de tubos de ensayo
- Agua destilada o desionizada
- Envase de 1 litro
- Frasco de lavado
- Toallas de papel
- Cámara de incubación

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*. Todos los componentes de derivados sanguíneos humanos han sido ensayados respecto a la presencia de HbsAg, VHC, VIH-1 y 2 y el virus linfotrofo de células T humanas (VLTH-I), siendo negativos en los ensayos necesarios según la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos). Todas las muestras de suero y los derivados sanguíneos humanos deben tratarse como un material potencialmente peligroso, independientemente de su origen. En consecuencia, deben seguirse unas prácticas de laboratorio adecuadas durante el almacenamiento, dispensación y eliminación de dicho material<sup>7</sup>.

**PRECAUCIÓN** - La azida sódica (NaN<sub>3</sub>) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas muy explosivas. Después y desechar los líquidos, es necesario lavar con un volumen grande de agua para evitar la acumulación de azida. La azida sódica puede ser tóxica si se

ingere. En caso de ingestión, notificarlo inmediatamente al director del laboratorio o al centro toxicológico.

Para poder garantizar la obtención de resultados válidos, deben seguirse de forma exacta las instrucciones indicadas en este prospecto. No intercambiar componentes del equipo por otros diferentes que no tengan el mismo número de catálogo de IMMCO. No utilizar este equipo después de la fecha de caducidad.

## **OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

Para la realización de esta determinación sólo debe utilizarse suero. Las muestras con hemólisis macroscópica, lipémicas o contaminadas por microorganismos pueden interferir en el funcionamiento del ensayo y, por tanto, no deben ser utilizadas. Almacenar las muestras a una temperatura de 2-8°C durante un período no superior a una semana. Cuando se desee un almacenamiento más prolongado, el suero debe congelarse a una temperatura de -20°C. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

## **PROCEDIMIENTO**

### **Método de ensayo**

#### **A. Detección sistemática**

1. Diluir 1:10 el suero de cada paciente con el diluyente de la muestra suministrado (10 de suero + 90 µl del diluyente). No diluir los Controles Positivo o Negativo. Guardar el suero no diluido para la determinación del título de anticuerpos si los resultados son positivos.
2. Permitir que los pocillos de los portaobjetos que contienen el sustrato se equilibren a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraer con cuidado los portaobjetos sin tocar el sustrato.
3. Etiquetar los portaobjetos y colocarlos en una cámara de incubación cubierta con toallas de papel humedecidas con agua para evitar la desecación.
4. Invertir el vial cuentagotas y presionar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) del Control Negativo en el pocillo nº 1. De forma similar, aplicar una gota del Control Positivo en el pocillo nº 2. Evitar llenar demasiado los pocillos.
5. Con el empleo de una micropipeta o una pipeta Pasteur, colocar 1 gota del suero diluido del paciente (aproximadamente 50 µl) en los restantes pocillos. Evitar llenar demasiado los pocillos.
6. Tapar la cámara de incubación e incubar los portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Quitar la tapa de la cámara de incubación. Coger el portaobjetos por el extremo y lavar suavemente con 10 ml de PBS mediante el empleo de una pipeta o lavar el portaobjetos en un vaso de precipitado lleno de PBS. No emplear un frasco de lavado. Transferir inmediatamente el portaobjetos al frasco de Coplin y dejarlo durante 10 minutos. Repetir el proceso con todos los portaobjetos restantes.
8. Extraer el portaobjetos del frasco de Coplin. Secar el extremo del portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Colocar el portaobjetos en la cámara de incubación, Invertir inmediatamente el vial cuentagotas del Conjugado y apretar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) en cada pocillo.
9. Repetir las etapas 7 y 8 con cada portaobjetos.
10. Tapar la cámara de incubación. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraer el portaobjetos del incubador. Sumergir el portaobjetos en un vaso de precipitado con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Colocar el portaobjetos en una cubeta de tinción llena con PBS durante 10 minutos. Al final del lavado puede añadirse, si se desea, 2-3 gotas de colorante de contraste azul de Evans. Repetir el proceso con los portaobjetos restantes. NOTA: un lavado inadecuado puede repercutir en la morfología de los neutrófilos y puede originar un incremento de la fluorescencia de fondo.

12. Extraer el portaobjetos de la cubeta de tinción. Secar el portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Para evitar que se seque el portaobjetos, realizar inmediatamente, mientras el portaobjetos todavía está húmedo, el proceso descrito en el apartado 13.
13. Añadir 3 gota del Medio de Preparación uniformemente en cubreobjetos y colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos. Evitar la aplicación de una presión excesiva y el movimiento lateral del cubreobjetos.
14. Repetir las etapas 12 y 13 con cada portaobjetos.
15. Examinar el desarrollo de fluorescencia específica en un microscopio de fluorescencia a 200x o más aumentos.

Los portaobjetos pueden leerse al terminar su preparación. Sin embargo, debido a que el medio de preparación contiene un agente antidestecimiento, puede retrasarse la lectura durante un período de hasta 48 horas sin que se produzca una pérdida significativa de la intensidad de la tinción. Los portaobjetos deben almacenarse en la oscuridad a una temperatura de 2-8°C.

**B. Determinación del punto de valoración (titulación)**

Los sueros positivos durante el ensayo pueden valorarse de forma adicional, etapas 6 - 15, para determinar su titulación. Cada funcionamiento de prueba debe incluir la uno Portaobjeto con el Control Negativo no diluido e diluciones de 1:2, de 1:4, de 1:8 y de 1:16 del Anti-IC Control Positivo. Hacer las diluciones dobles seriales del suero del paciente que comienza en 1:10 (véase el diagrama siguiente). Usando otra diapositiva, un positivo del suero para los anticuerpos intercelulares se puede probar en las diluciones que se extienden a partir de 1:10 a 1:320. Una diapositiva adicional se debe utilizar todavía para obtener las puntos finales para el positivo de los sueros de esos pacientes en una dilusión de 1:320.

Un positivo del suero para los anticuerpos anti-BMZ cuando está defendido en las diluciones que doblan de 1:10 a 1:80 se puede divulgar como positivo, ≥ 80. Si en lugar de otro, un suero se ha defendido en 1:20 y 1:40, después preparar las dos diluciones adicionales del doblar de 1:80 a 1:640 y utilizar una diapositiva adicional. Incluir el control de la BMZ en un pozo y el Control Negativo en otro bien. No diluyen estos controles.

El recíproco de la dilusión más alta que produce una reacción positiva es el título.

**Preparación de las diluciones seriadas**

Por suero IC-positivo, numerar cuatro tubos del 1 al 12. Añadir 0.9 ml del diluyente de la muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 12. Pipetear 0,1 ml del suero no diluido en el tubo 1 y mezclar minuciosamente. Transferir 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezclar meticulosamente. Continuar transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente tras la mezcla y, de este modo, conseguir las diluciones ilustradas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4	5	6, etc
Suero	0,1 ml					
	+					
Diluyente tamponado	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↗	↗	↗	↗	↗
Transferencia		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilución final	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

Para los sueros positivos anti-BMZ cuando está probado en 1:20 y 1:40, numerar siete tubos 1 a 7 y hacer las diluciones según lo descrito arriba.

**CONTROL DE CALIDAD**

En cada serie de ensayos debe incluirse un control positivo y negativo. El control negativo no debe mostrar fluorescencia específica del IC e BMZ áreas; por el contrario, el control positivo debe tener una

intensidad de tinción igual o superior a 2+ del IC e BMZ áreas. Sobre la titulación del control positivo anti-IC, un título de la punto final de 8 + una diluciones que doblan debe ser obtenido.

Cuando no se obtienen los resultados esperados, debe repetirse el ensayo. Los resultados anómalos con los controles pueden producirse por:

- Turbidez. Desechar y utilizar otro control.
- Problemas del sistema óptico del microscopio de fluorescencia. Estos problemas pueden incluir un alineamiento inadecuado, una lámpara con fecha posterior a la esperanza de vida útil, etc.
- Secado del portaobjetos durante el procedimiento.

Las reacciones se proporcionan como ejemplos en Figures 1 y 2 en el extremo de este documento.

## **RESULTADOS**

Los resultados de las pruebas para los anticuerpos anti-IC se deben divulgar como negativos (< 10) o positivo con título. Los resultados de las pruebas para los anticuerpos anti-BMZ se deben divulgar como la negativa (< 10), positivo ( $\geq 80$  o  $\geq 640$ ) o alternativamente, positivo con título.

Leído para mancharse específico de la intercelular epitelial sustancia o de la basement membrana zona. Los anticuerpos otros como ANA, mitochondrial, lisos del músculo, EMA, y los anticuerpos al músculo estriado se pueden también observar en las secciones del esófago del primate y del conej. de India<sup>4</sup>. Los sueros que dan cualesquiera de estas reacciones se deben divulgar como negativa para los anticuerpos a intercelular y a los antígenos de la BMZ.

## **LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

En algunos sueros intercelulares y los anticuerpos de la membrana del sótano puede estar presente en títulos el variar según lo indicado por diversos patrones que se manchan. Ambos patrones del anticuerpo y sus títulos deben ser divulgados. Coloración fuerte del objeto expuesto de la estera de los sueros de Occasionally para la ANECDOTARIO, anticuerpos al citoplasma, y coloración no específica de la capa espinosa o básica de epitelio. Éstos pueden interferir con la capacidad de detectar los anticuerpos anti-IC y del BMZ, respectivamente. En tales casos la titulación del suero puede permitir la visualización de los anticuerpos de la piel. En otros casos pueden estar en un título más bajo que el ANA o los anticuerpos citoplásmicos.

En la última situación, el suero se debe divulgar como negativa para los anticuerpos intercelulares y del sótano de la membrana, pero debe ser mencionado que los anticuerpos de la piel no pueden ser excluidos. En casos tales como éstos, los estudios de la biopsia por inmunofluorescencia directa se recomiendan.

La Conjugado provisto en este kit es sobre todo específico de cadena pesado pero tiene cierta actividad de cadena ligera. Reacciona sobre todo con los autoanticuerpos de la clase IgG, pero puede, a un poco grado, reaccionar con las cadenas ligeras de otras clases tales como IgM.

Una reacción positiva del BMZ con un patrón linear es constante con una diagnosis del pemphigoid (es decir pemphigoid bullar u otras formas de pemphigoid) o del EBA. El método indirecto de la inmunofluorescencia que usa estos substratos no puede distinguir entre estas dos enfermedades.

Una reacción positiva del IC no es de diagnóstico de pemphigus. Tales reacciones pueden también ser debido a los anticuerpos del grupo sanguíneo o los pemphigus-like anticuerpos. Se recomienda que todos los sueros positivos para los anticuerpos intercelulares estén absorbidos para distinguir esos sueros que dan mancharse intercelular positivo debido a los anticuerpos del grupo sanguíneo<sup>3</sup>.

Por lo tanto, los clínicos necesitan considerar los resultados del suero junto con los resultados clínicos y otros estudios del laboratorio, notablemente histopatología y dirigir la inmunofluorescencia de los especímenes de la biopsia de la piel, hacia la diagnosis del pemphigus o del pemphigoid.

**VALORES PREVISTOS**

Casi todos los pacientes del pemphigus tienen anticuerpos IC. El uso de los sustratos duales aumenta la sensibilidad de detectar los anticuerpos intercelulares según lo indicado en los datos en la tabla 1 en el extremo de este documento en 123 pacientes del pemphigus.

Además de aumentar la sensibilidad, el uso de ambos sustratos del tejido fino permite la diferenciación inmunológica del pemphigus vulgaris de pemphigus foliaceus en la mayoría de los casos <sup>4-6</sup>. Según lo ilustrado en la tabla 2, los sueros del pemphigus vulgaris dan generalmente títulos más altos y/o mancharse más brillante en el esófago del mono que en el esófago del conejillo de Indias, mientras que el contrario es verdad para los sueros del pemphigus foliaceus.

La comparación de títulos de los anticuerpos del pemphigus en sueros anteriores y actuales de pacientes con una diagnosis probada del pemphigus produce la información pronóstica valiosa puesto que las fluctuaciones en título tienden para ser paralelo a la actividad de la enfermedad según lo demostrado en Figure 4. Los títulos producen la información útil para el ajuste de las dosis de agentes terapéuticos; los pacientes con títulos residuales pero ningunas lesiones pueden esperar tener recaídas si la terapia se retira <sup>6</sup>. El porcentaje de los pacientes del pemphigoid con los anticuerpos anti-BMZ varía con la forma de la enfermedad según lo demostrado en Table 3.

La diferenciación de los anticuerpos del y del pemphigoid requiere métodos de prueba especiales <sup>8-10</sup>. El método recomendado es una prueba indirecta de la inmunofluorescencia de los anticuerpos BMZ en la piel normal partida con NaCl del 1M<sup>9</sup>. Los títulos de los anticuerpos anti-BMZ no son paralelo a generalmente actividad de la enfermedad al igual que los anticuerpos del pemphigus.

**CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO**

Los sueros obtenidos a partir de 38 temas normales, 10 confirmaron los casos del pemphigus vulgaris, 10 confirmaron casos del pemphigus foliaceus y 20 confirmaron casos del pemphigoid o el EBA fue probado en este kit y otro kit comercialmente disponible del anticuerpo de la piel. Los sueros fueron probados según los procedimientos recomendados por los fabricantes. Los resultados que usaban el ImmuGlo™ Anti-Skin Antibody (IC/BMZ) Test System demostrado aumentaron sensibilidad así como la especificidad comparable (Table 4).



# Immulo™ Anti-Pelle Anticorpo (IC/BMZ)

## Sistema

### Substrato di primate/cavia domestica esofago

IVD
-----

REF	Code: 1104	48 determinazioni
-----	------------	-------------------

Dosaggio in immunofluorescenza indiretta per l'individuazione e la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi di pelle (IC/BMZ) nel siero umano.

#### CARATTERISTICHE GENERALI

La rilevazione di anti-pelle anticorpi aiuta nella diagnosi e nella prognosi delle malattie vescicolare-bollose croniche compreso il penfigo, il penfigoid, il penfigoid cicatriziale ed il epidermolysis bullosa acquisita (EBA)<sup>1</sup>. Gli anticorpi intercellulari epiteliali sono diagnostici per il penfigo e si presentano dentro più di 90% dei sieri da tutti gli interventi concreti<sup>2</sup>. A causa della specificità di specie degli anticorpi di IC, l'uso dei substrati doppi (primate/ cavia domestica esofago) ulteriori distingue gli anticorpi intercellulari del penfigo vulgaris e del pemphigus vegetans, che reagiscono preferenzialmente con le sezioni dell'esofago della primate, dagli anticorpi del penfigo foliaceus e del penfigo erythematous che reagiscono più fortemente con le sezioni dell'esofago della cavia domestica<sup>3-6</sup>. Gli anticorpi agli antigeni di BMZ di epitelio squamoso stratificato si presentano in circa 70% di penfigoid bolloso attivo, in 50% di penfigoid vescicolare e di EBA ed in 10% dei pazienti del penfigoid cicatriziale. Gli anticorpi della BMZ reagiscono solitamente con sia le sezioni dell'esofago della primate che dell'esofago della cavia domestica<sup>3-6</sup>.

#### PRINCIPIO DEL METODO

Nella metodica in immunofluorescenza indiretta utilizzata in questo kit, i sieri dei pazienti vengono incubati su primate/cavia domestica esofago per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Tutti gli anticorpi non legati vengono eliminati sciaccando il vetrino, mentre gli anticorpi legati del tipo IgG vengono individuati mediante incubazione del substrato con coniugato anti IgG umana, marcato con fluoresceina. Per osservare le reazioni si utilizza un microscopio a fluorescenza dotato di filtri adatti. Una fluorescenza verde mela del strutture istologiche conferma la presenza di IC o BMZ anticorpi. Mediante l'analisi di diluizioni seriali si determina quindi il titolo (il reciproco della diluizione più elevata che causa una reazione positiva).<sup>2</sup>

#### CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

##### Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a una temperatura di 2-8°C. I reagenti sono pronti per l'uso dopo averli portati a temperatura ambiente.

##### Materiali forniti

Immulo™ Anti-Pelle Anticorpo (IC/BMZ) IFA 



 1104

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 48 determinazioni ciascuno.

<b>8 x</b>	<table border="1">SORB</table> <table border="1">SLD</table> <table border="1">6</table>	Vetrini-substrato di primate/cavia domestica esofago con 6 pozzetti
<b>1 x 0.5 ml</b>	<table border="1">CONTROL</table> <table border="1">+</table> <table border="1">IC</table> *	Controllo positivo anti-IC, siero umano con BSA
<b>1 x 0.5 ml</b>	<table border="1">CONTROL</table> <table border="1">+</table> <table border="1">BMZ</table> *	Controllo positivo anti-BMZ, siero umano con BSA

## IT

1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> - *	Controllo negativo, siero umano con BSA
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> <b>EB</b> †*	Conjugato FITC anti-umana IgG con Blu di Evans. Tenere lontano dalla luce.
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Diluyente per campioni con BSA
2 vials	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	Tampone fosfato-salino (PBS). Ricostituire ciascun flaconcino con 1 litro d'acqua
1 x 5 ml	<b>MOUNTING</b> <b>MEDIUM</b> *	Mezzo Montante. Non congelare.
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	Vetrini coprioggetto

### Componenti facoltative

1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> <b>PA</b> *	<b>REF</b> 2099 Coniugato FITC anti-umana IgG (Primate assorbente). Riduce la fluorescenza della priorità bassa sul substrato del primate. Tenere lontano dalla luce.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> *	<b>REF</b> 2100X. Coniugato FITC anti-umana IgG. Tenere lontano dalla luce.
1 x 1 ml	<b>EVANS</b> *	<b>REF</b> 2510. Blu di Evans

\* Contiene < 0,1% NaN<sub>3</sub>

† Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub> Sostituisce il coniugato senza Blu di Evans nei numeri di codice che contengono "EB"

### Material required but not provided

- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta Pasteur
- Pipette sierologiche
- Piastra di colorazione (ad esempio vaschetta di Coplin)
- Piccole provette (ad es. 13 x 75 mm) e porta provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro
- Bottiglia di lavaggio
- Carta assorbente
- Incubatore

### AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. Il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato controllato ed è risultato negativo ai test richiesti dalla FDA per la presenza dell'HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I. Tuttavia, maneggiare tutti i campioni di siero umano e i prodotti di origine umana come fonte potenziale di infezione, indipendentemente dalla loro origine, seguendo le normali pratiche di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e l'eliminazione di questi materiali<sup>7</sup>. ATTENZIONE - La sodio azide (NaN<sub>3</sub>) può dar luogo a reazioni chimiche pericolose. Per lo smaltimento dei residui delle analisi attenersi scrupolosamente alle norme CDC e alle norme di legge in materia. La sodio azide è

tossica, se ingerita; in questo caso, informare immediatamente il responsabile del laboratorio o un centro per casi di avvelenamento.

Al fine di assicurare risultati validi, si raccomanda di attenersi alle istruzioni riportate in questo inserto. Non scambiare i componenti del kit se non con quelli aventi lo stesso numero di catalogo della IMMCO. Non utilizzare oltre la data di scadenza.

2. Lasciare che i sacchetti contenenti i vetrini-substrato raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti, quindi estrarre i vetrini facendo attenzione a non toccare il substrato.
3. Marcare i vetrini e porli in una camera umida.
4. Capovolgere il flaconcino contagocce e versare delicatamente 1 goccia (circa 50 µl) del Controllo Negativo nel pozzetto no. 1. Allo stesso modo versare 1 goccia del Controllo Positivo nel pozzetto no. 2, evitando di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Con una micropipetta o con la pipetta Pasteur, versare 1 goccia del siero diluito del paziente (circa 50 µl) negli altri pozzetti, evitando di riempirli eccessivamente.
6. Mettere il coperchio sulla camera umida ed incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
7. Togliere un vetrino dalla camera umida. Tenendo il vetrino per l'estremità della linguetta, sciacquarlo delicatamente con circa 10 ml di PBS utilizzando una pipetta o sciacquarlo in un becher pieno di PBS. Non utilizzare la bottiglia di lavaggio. Trasferire il vetrino immediatamente nella vaschetta di Coplin e lavare per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
8. Togliere il/i vetrino/i dalla vaschetta di Coplin. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Porre il vetrino nella camera umida. Capovolgere immediatamente il flaconcino contagocce del Coniugato e versarne delicatamente 1 goccia (circa 50 µl) in ciascun pozzetto.
9. Ripetere i punti 7 e 8 per ciascun vetrino.
10. Riporre il coperchio sulla camera umida ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
11. Togliere un vetrino dalla camera umida e tenendolo per l'estremità della linguetta, immergerlo in un becher pieno di PBS per togliere il coniugato in eccesso. Porre il/i vetrino/i in una piastra di colorazione piena di PBS per 10 minuti. Se si desidera, si possono aggiungere 2-3 gocce di Blu di Evans al lavaggio finale. Ripetere per gli altri vetrini. NOTA: Un lavaggio scorretto può influenzare la morfologia dei neutrofili e causare una maggiore fluorescenza di fondo.
12. Togliere un vetrino dalla piastra di colorazione. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Per evitare che il vetrino si secchi, passare immediatamente al punto 13 mentre è ancora bagnato.
13. Montare il vetrino coprioggetto versando delicatamente 3 **goccia** uniformemente di Terreno di allestimento su vetrino coprioggetto, quindi porre il coprioggetto sul vetrino. Non applicare eccessiva pressione ed evitare che il coprioggetto si sposti lateralmente.
14. Ripetere i punti 12 e 13 per ciascun vetrino.
15. Esaminare la fluorescenza specifica con un microscopio a fluorescenza a un ingrandimento di almeno 200x.

I vetrini si possono leggere appena vengono preparati. Tuttavia, grazie a un agente anti evanescenza presente nel liquido di montaggio, non si verifica alcuna perdita significativa di intensità di colorazione, se la lettura viene posticipata fino a 48 ore. I vetrini devono essere conservati al buio a una temperatura di 2-8°C.

## B. Determinazione dell'endpoint (Titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere ulteriormente analizzato seguendo i punti da 5 a 13 per determinarne il titolo. Ciascuna sessione analitica deve includere i Controlli Positivi e Negativi. Effettuare diluizioni seriali doppie partendo da 1:10. Il reciproco della diluizione più elevata che produce una reazione positiva è il titolo.



## Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare quattro provette da 1 a 4. Aggiungere 0,9 ml di Diluente per Campioni alla provetta 1 e 0,2 ml alle provette da 2 a 4. Pipettare 0,1 ml di siero non diluito nella provetta 1 e mescolare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta all'altra dopo aver mescolato per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

Provette	1	2	3	4	5	6, etc
<b>Siero</b>	0,1 ml					
	+					
<b>Diluente tamponato</b>	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↗	↗	↗	↗	↗
<b>Trasferimento</b>		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
<b>Diluizione finale</b>	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

## CONTROLLO DI QUALITÀ

Sia i controlli positivi che negativi dovrebbero essere inclusi con ogni elaborazione di prova. Il controllo negativo non dovrebbe non mostrare la fluorescenza specifica delle BMZ o intercellulari. Il controllo positivo anti-IC ed il controllo positivo anti-BMZ dovrebbero avere 2+ o intensità di macchiatura più grande delle BMZ ed intercellulari, rispettivamente, su entrambi i substrati. Sulla titolazione del controllo positivo anti-IC, un titolo di punto finale di  $8 \pm$  una diluizione raddoppiantesi dovrebbe essere ottenuto.

Le reazioni del campione sono fornite nella figure 1 e 2 all'estremità di questo documento.

Se non si ottengono i risultati attesi, bisognerà ripetere l'analisi. Se continuano a verificarsi risultati inadeguati con i controlli, le cause possono essere:

- Torbidità. Scartare e utilizzare un altro controllo.
- Problemi al sistema ottico del microscopio a fluorescenza, quali allineamento non corretto, bulbo scaduto, ecc.
- Essiccamento del vetrino durante la procedura.

## RESULTS

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati delle prove per anti gli anticorpi di IC dovrebbero essere segnalati come negativi (< 10) o positivo con il titolo. I risultati delle prove per anti gli anticorpi di BMZ dovrebbero essere segnalati come la negazione (< 10), positivo (>\_80 o >\_640) o alternativamente, positivo con il titolo.

Colto per la macchiatura specifica della sostanza o del BMZ intercellulare epiteliale. I vari anticorpi del tessuto quale ANA, mitocondriali, gli anticorpi citoplasmici e superiori citoplasmici, lisci del muscolo, endomysial, cellule basale citoplasmici e gli anticorpi al muscolo striato possono anche essere osservati sul substrate dell'esofago<sup>4</sup>. I sieri con c'è ne di queste reazioni dovrebbero essere segnalati come negazione per gli anticorpi a IC ed agli antigeni di BMZ.

### LIMITI DELLA PROCEDURA

In alcuni sieri sia gli anticorpi di BMZ che di IC possono essere presenti nei titoli di variazione come indicato dai modelli di macchiatura differenti. Entrambi i modelli dell'anticorpo ed i loro titoli dovrebbero essere segnalati. I sieri possono esibire occasionalmente la forte macchiatura per gli anticorpi della ANA al citoplasma e la macchiatura non specifica degli anticorpi citoplasmici delle cellule spinous o basali. Questi possono interferire con la capacità di rilevare gli anticorpi di BMZ e di IC. In tali casi titolare il siero può aiutare la visualizzazione degli anticorpi della pelle. In altri casi possono essere nel titolo più basso che il ANA o gli anticorpi citoplasmici.

Nella situazione posteriore, il siero dovrebbe essere segnalato come negazione per gli anticorpi di BMZ e di IC, ma dovrebbe essere accennato che gli anticorpi della pelle non possono essere esclusi. In questi casi, gli studi di biopsia dall'immunofluorescenza diretta sono suggeriti.

Il coniugato fornito in questo corredo è soprattutto specifico catena pesante ma ha certa attività catena chiara. Reagisce soprattutto con gli anticorpi di IgG, ma può, ad un poco grado, reagire con le catene chiare di altri codici categoria, quale IgM.

Una reazione positiva dell'anticorpo di BMZ con un modello lineare è costante con una diagnosi di penfigoid (cioè penfigoid bolloso o altre forme di penfigoid) o di EBA. Il metodo indiretto di IFA che usando questi substrati non può distinguersi fra queste due malattie. Una reazione positiva di IC non è diagnostica del penfigo. Tali reazioni possono anche essere dovute agli anticorpi del gruppo sanguigno o penfigo-come gli anticorpi. È suggerito che tutti i sieri positivi per gli anticorpi di IC sono assorbiti per distinguere quei sieri che danno le reazioni positive di IC dovute agli anticorpi del gruppo sanguigno<sup>3</sup>.

I clinici devono considerare i risultati del siero insieme ai risultati clinici e ad altre ricerche di laboratorio, considerevolmente l'istopatologia e dirigere l'immunofluorescenza degli esemplari di biopsia della pelle, nella diagnosi del penfigo o del penfigoid.

## VALORI PREVISTI

Quasi tutti i pazienti di pemphigus hanno anticorpi di IC. L'uso dei substrati doppi aumenta la sensibilità di rilevazione degli anticorpi intercellulari come indicato dai dati in tabella 1 all'estremità di questo documento su 123 pazienti di penfigo.

Oltre che l'aumento della sensibilità, l'uso di entrambi i substrati del tessuto permette la differenziazione immunologica del penfigo vulgaris dal foliaceus nella maggior parte dei casi di penfigo<sup>4-5</sup>. Come illustrato in tabella 2, i sieri penfigo vulgaris danno generalmente gli più alti titoli e/o la macchiatura più luminosa sull'esofago della primate che sull'esofago della cavia domestica, mentre l'opposto è allineare per i sieri di penfigo foliaceus.

Il confronto dei titoli degli anticorpi di penfigo in sieri precedenti e correnti dai pazienti con una diagnosi provata del penfigo si permette le informazioni prognostiche importanti poiché le fluttuazioni nel titolo tendono a mettere l'attività in parallelo di malattia come appare figura 4. I titoli si permettono le informazioni utili per la registrazione delle dosi degli agenti terapeutici; i pazienti con i titoli residui ma nessun lesioni possono essere previsti avere ricadute se la terapia è ritirata<sup>5</sup>.

La percentuale dei pazienti del penfigoid con gli anticorpi della BMZ varia con la forma della malattia come indicata dalla tabella 3.

La differenziazione degli anticorpi del EBA e del penfigoid richiede i metodi di prova speciali<sup>8-10</sup>. Il metodo suggerito è una prova di immunofluorescenza indiretta degli anticorpi della BMZ su pelle normale spaccata con il 1M NaCl<sup>9</sup>. I titoli degli anticorpi BMZ non mettono solitamente l'attività in parallelo di malattia come gli anticorpi di penfigo.

## CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONI

I sieri ottenuti da 38 oggetti normali, 10 hanno confermato i casi del penfigo vulgaris, 10 hanno confermato i casi del penfigo foliaceus e 20 hanno confermato i casi di penfigoid o EBA sono stati esaminati su questo corredo e su un altro corredo disponibile in commercio dell'anticorpo della pelle. I sieri sono stati esaminati secondo le procedure suggerite dai fornitori. I risultati che usando il sistema IC/BMZ di IMMCO indicato hanno aumentato la sensibilità così come la specificità paragonabile. Vedere la tabella 4.



**Système de test des anticorps anti-peau  
(IC/ZAMB) d'ImmuGlo™  
Sections de l'œsophage de singe / cochon d'Inde**

Pour utilisation avec diagnostic *in vitro* **DIV**

Complexité CLIA : élevée

Code d'identification d'analyse du CDC : 0449

Code d'identification du système de test du CDC : 28313

Code de **REF** : 1104 48 mesures

## ENCART DE PRODUIT

### APPLICATION

Un test anticorps par immunofluorescence indirecte pour la détection et la quantification d'anticorps anti-peau (anti-intercellulaire et anti-membrane basale) dans le sang humain.

### RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La détection d'anticorps anti-peau aide au diagnostic, et parfois au pronostic, des maladies vésiculaires-bulleuses chroniques, y compris le pemphigus, pemphigoïde, pemphigoïde cicatricielle et épidermolyse bulleuse acquise (EBA)<sup>1</sup>. Les anticorps intercellulaires de l'épithélium sont un diagnostic pour le pemphigus et se produisent dans plus de 90 % du sang à partir de toutes les formes actives<sup>2</sup>. En raison de la spécificité des espèces d'anticorps intercellulaires, l'utilisation de substrat double d'œsophage de singe / cochon d'Inde permet de faire une distinction supplémentaire des anticorps intercellulaires du pemphigus vulgaire et végétant, qui réagissent préférentiellement avec les sections d'œsophage de singe, des anticorps du pemphigus foliacé et érythémateux qui réagissent plus fortement avec les sections d'œsophage du cochon d'Inde<sup>3-6</sup>. Les anticorps aux antigènes de la membrane basale des épithéliums squameux stratifiés se produisent dans environ 70 % des pemphigoïdes bulleux actifs, 50 % des pemphigoïde vésiculaires et EBA et 10 % des patients souffrant de pemphigoïde cicatricielle. Les anticorps de la membrane basale réagissent généralement avec à la fois les sections d'œsophage de singe et de cochon d'Inde<sup>3-6</sup>.

### PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce kit, le sang des patients est incubé sur les sections d'œsophage de singe / cochon d'Inde afin de permettre la liaison des anticorps au substrat. Tous les anticorps qui ne sont pas liés sont enlevés au rinçage. Les anticorps liés de la classe IgG sont détectés par incubation de ces sections avec un conjugué anti-humain IgG marqué à la fluorescéine. Les réactions sont observées sur un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés.

La présence des anticorps anticellulaires et anti-membranes de base est démontrée par une fluorescence vert pomme de ces structures histologiques respectives. Le titre (la réciproque de la plus forte dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé en testant les dilutions en série<sup>2</sup>.

### INFORMATIONS SUR LE PRODUIT

#### Stockage et préparation

Stocker tous les réactifs entre 2 et 8 °C. Les réactifs sont prêts à être utilisés après équilibrage à la température ambiante.

**Matériaux fournis**Code de **REF** : 1104 48 mesures

<b>8 x</b>	<b>SORBER</b>   <b>SCELLÉ</b>   <b>6</b>	6 puits pour préparations de substrat, œsophage de singe / cochon d'Inde
<b>1 x 0,5 ml</b>	<b>CONTRÔLE</b>   <b>+</b>   <b>INTERCELLULAIRE</b> * †	Régulation positive des anticorps intercellulaires. Contient du sang humain.
<b>1 x 0,5 ml</b>	<b>CONTRÔLE</b>   <b>+</b>   <b>ZAMB</b> * †	Régulation positive des zones anti-membrane basale. Contient du sang humain.
<b>1 x 0,5 ml</b>	<b>CONTRÔLE</b>   <b>-</b> * †	Contrôle négatif. Contient du sang humain.
<b>1 x 5 ml</b>	<b>IgG-CONJ</b>   <b>FITC</b>   <b>EB</b> * †	Conjugué anti-humain FITC contenant du bleu d'Evans. À protéger de la lumière.
<b>1 x 60 ml</b>	<b>TAMP</b> * †	Diluant tampon.
<b>2 fioles</b>	<b>TAMP</b>   <b>LAVAGE</b>	Tampon phosphate salé (TPS). Dissoudre chaque fiole dans 1 litre.
<b>1 x 5 ml</b>	<b>MONTAGE</b>   <b>SUPPORT</b> * †	Support de montage. Ne pas congeler.
<b>1 x 12</b>	<b>COUVERCLE</b>   <b>SCELLÉ</b>	Lamelles.

**Composants en option**

<b>1 x 5 ml</b>	<b>IgG-CONJ</b>   <b>FITC</b>   <b>PA</b> * †	<b>REF</b> 2099. Conjugué GIG anti-humain FITC (adsorbé sur primate). À PROTÉGER de la LUMIÈRE. RÉDUIT la fluorescence de l'arrière-plan sur le substrat de primate.
<b>1 x 5 ml</b>	<b>IgG-CONJ</b>   <b>FITC</b> * †	<b>REF</b> 2100X. Conjugué IgG anti-humain FITC. À PROTÉGER de la LUMIÈRE.
<b>1 x 1 ml</b>	<b>EVANS</b> * †	<b>REF</b> 2510. Conjugué IgG anti-humain FITC. À PROTÉGER de la LUMIÈRE.

\* Contient < 0,1 % NaN<sub>3</sub>

† Remplace le conjugué sans contre-colorant dans les numéros de code contenant « EB »

**Matériaux nécessaires, mais non fournis**

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Récipient de coloration (par ex. cuvette de Coplin)
- Petites éprouvettes (par ex. 13 x 75 mm) et support pour éprouvettes
- Eau distillée ou désionisée
- Récipient de 1 litre
- Flacon de lavage
- Serviettes papier
- Chambre d'incubation

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour utilisation avec diagnostic *in vitro*. Toutes les composantes à dérivée humaine utilisées ont été testées pour HBsAg, HCV, HIV-1 et 2 et HTLV-I et tous les tests requis par la FDA sont revenus négatifs. Toutefois, les dérivés de sang humain et les spécimens des patients doivent être considérés comme potentiellement infectieux, indépendamment de leur origine. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire en matière de stockage, de distribution et d'élimination de ces matériaux.<sup>7</sup>

**AVERTISSEMENT** : L'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) peut réagir avec le plomb et le cuivre pour former des azotures métalliques hautement explosifs. Lors de la mise au rebut des liquides, rincez avec de grands volumes d'eau afin d'éviter l'accumulation d'azotures. L'azoture de sodium peut être toxique si ingéré. Si ingéré, allez immédiatement voir le directeur du laboratoire ou un centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement comme elles sont présentées dans cet encart afin d'assurer des résultats valides. Ne pas échanger les composants du kit avec ceux de sources autres que ceux ayant le même numéro de catalogue d'IMMCO. Ne pas utiliser après la date d'expiration.

## COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Seuls les spécimens de sang doivent être utilisés pour cette procédure. Les spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou contaminés par des microbes peuvent interférer avec la performance de ce test et ils ne doivent pas être utilisés. Stocker les spécimens entre 2 et 8 °C et pas plus d'une semaine. Pour un stockage plus long, le sang doit être congelé à -20 °C. Éviter les congélations et décongélations répétées des échantillons.

## PROCÉDURE

### Méthode de test

#### A. Dépistage

1. Diluer à 1:10 le sang de chaque patient avec le diluant tampon (10 µl de sang + 90 µl de diluant). Ne pas diluer les résolutions positives ou négatives. Sauvegarder les échantillons sanguins non dilués pour déterminer les titres d'anticorps si les tests de dépistage s'avèrent positifs.
2. Laisser les poches contenant les préparations de substrat s'équilibrer à la température ambiante pendant 10 à 15 minutes. Retirer avec précaution les préparations sans toucher le substrat.
3. Étiqueter les préparations et les mettre dans une chambre d'incubation tapissée de serviettes en papier humidifiées avec de l'eau pour empêcher qu'elles sèchent.
4. Inverser la pipette compte-goutte et appuyer doucement pour appliquer 1 goutte (environ 50 µl) du contrôle négatif dans le puits n° 1. D'une manière similaire, appliquer 1 goutte de contrôle positif dans le puits n° 2. Éviter de trop remplir les puits.
5. À l'aide de la micropipette ou de la pipette Pasteur, appliquer 1 goutte du sang dilué du patient (environ 50 µl) aux autres puits. Éviter de trop remplir les puits.
6. Mettre le couvercle sur la chambre d'incubation et incuber les préparations pendant 30 minutes à température ambiante.
7. Retirer le couvercle de la chambre d'incubation. Tenir la préparation du côté de la languette et rincer délicatement avec environ 10 ml de TPS à l'aide d'une pipette, ou rincer la préparation dans un vase à bec rempli de TPS. Ne pas utiliser de flacon de lavage. Transférer immédiatement la préparation dans une cuvette de Coplin et laver pendant 10 minutes. Répéter cette procédure avec toutes les préparations restantes.
8. Retirer la ou les préparations de la cuvette de Coplin. Sécher le bord de la préparation avec une serviette en papier pour enlever l'excès de TPS. Mettre la préparation dans la chambre d'incubation. Inverser immédiatement la pipette compte-goutte du conjugué et appuyer doucement pour appliquer 1 goutte (environ 50 µl) à chaque puits.
9. Répéter les étapes **7 et 8** pour chaque préparation.

10. Remettre le couvercle sur la chambre d'incubation. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
11. Retirer une préparation de l'incubateur. Tenir la préparation au niveau de la languette et tremper la préparation dans un vase à bec contenant du TPS pour retirer l'excès de conjugué. Mettre la ou les préparations dans un récipient de coloration avec du TPS pendant 10 minutes. Si souhaité, 2 ou 3 gouttes de bleu d'Evans de contre-colorant peuvent être ajoutées au lavage final. Répéter pour les préparations restantes. REMARQUE : Un lavage incorrect peut entraîner une augmentation de la fluorescence de l'arrière-plan.
12. Retirer une préparation du récipient de coloration. Sécher le bord de la préparation avec une serviette en papier pour enlever l'excès de TPS. Pour empêcher que la préparation ne sèche, procéder immédiatement à l'étape suivante tant que la préparation est encore mouillée.
13. Mettre la lamelle en appliquant **3 gouttes** du support de montage uniformément sur la lamelle et la mettre sur la préparation. Éviter d'appliquer une pression excessive et empêcher le mouvement latéral de la lamelle.
14. Répéter les étapes 12 et 13 pour chaque préparation.
15. Examiner la fluorescence spécifique sous un microscope à fluorescence à un grossissement de 200 ou plus.

Les préparations peuvent être lues aussitôt qu'elles sont prêtes. Toutefois, en raison de la présence d'agent anticoloration dans le support de montage, aucune perte importante d'intensité de coloration ne se produit si la lecture est reportée jusqu'à 48 heures. Les préparations doivent être stockées dans l'obscurité entre 2 et 8 °C.

## B. Mesure du point limite (titrage)

Un sang positif dans un test de dépistage peut être encore testé en suivant les **étapes 5 à 13** pour déterminer le titre. Chaque essai doit comprendre la préparation avec le contrôle négatif non dilué et le contrôle positif anti-intercellulaire non dilué, dilué à 1:2, à 1:4, à 1:8e et à 1:16e. Effectuer des dilutions de raison 2 en série du sang du patient commençant à 1:10e (voir le diagramme suivant). En utilisant une autre préparation, un sang positif pour les anticorps intercellulaires peut être testé à des dilutions allant de 1:10e à 1:320e. Une préparation supplémentaire doit être utilisée pour obtenir des points limites pour les patients dont le sang est toujours positif à une dilution de 1:320e.

Un sang positif pour les anticorps anti-membrane basale lors d'un dépistage à doubles dilutions de 1:10e à 1:80e peut être reporté comme étant positif,  $\geq 80$ . Si à la place, le sang a été testé à 1:20e et 1:40e, alors préparer des dilutions de raison 2 supplémentaires de 1:80e et 1:640e et utiliser une préparation additionnelle. Inclure le contrôle de l'anti-membrane basale dans un puits et le contrôle négatif dans un autre puits. **NE PAS** diluer ces contrôles.

La réciproque de la dilution la plus élevée produisant une réaction positive est le titre.

## Préparation de dilutions en série

Pour les sangs positifs pour les anticorps intercellulaires lors du test de dépistage, numéroter douze éprouvettes de 1 à 12. Ajouter 0,9 ml de diluant tampon dans l'éprouvette 1 et 0,2 ml dans les éprouvettes 2 à 12. Pipetter 0,1 ml de sang non dilué de l'éprouvette 1 et mélanger soigneusement. Transférer 0,2 ml de l'éprouvette 1 à l'éprouvette 2 et mélanger soigneusement. Continuer à transférer 0,2 ml d'une éprouvette à la suivante après avoir mélangé pour obtenir les dilutions décrites dans le tableau suivant :

Éprouvettes	1	2	3	4	5	6, etc.
Sang	0,1 ml					
	+					
Diluant tampon	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transfert		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilution finale	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320, etc.

Pour les sangs positifs des anti-membranes basales lorsque testés à des dilutions de 1:20e et 1:40e, numéroter des éprouvettes de 1 à 7 et effectuer des dilutions comme précédemment décrit.

### Contrôle de la qualité

Les contrôles positifs et négatifs doivent tous être inclus avec chaque essai. Le contrôle négatif ne doit pas montrer de fluorescence spécifique des zones intercellulaires ou de la membrane basale. Le contrôle positif anti-cellulaire et le contrôle positif anti-membrane basale doivent tous les deux avoir une intensité de coloration de 2 + ou plus des zones intercellulaires de l'épithélium et anti-membrane basale respectivement, sur les deux substrats. Lors du titrage du contrôle positif anti-intercellulaire, une dilution double avec un titre de point limite de  $8 \pm$  doit être obtenue. Des réactions échantillons sont fournies dans les Figures 1 et 2 à la fin de ce document.

Si les résultats attendus ne sont pas obtenus, l'essai doit être répété. Si des résultats inadéquats continuent à se produire avec les contrôles, ces derniers peuvent être dus :

- à la turbidité. Jeter et utiliser un autre contrôle.
- Problèmes avec le système optique du microscope à fluorescence. Ils peuvent comprendre : un alignement incorrect, l'utilisation du bulbe au-delà de la durée de performance attendue, etc.
- Permettre le séchage de la préparation pendant la procédure.
- Préparation incorrecte des dilutions en série des contrôles.

### RÉSULTATS

Les résultats des tests pour les anticorps anti-intercellulaires doivent être rapportés comme négatifs (<10) ou positifs avec titre. Les résultats des tests pour les anticorps anti-membrane basale doivent être rapportés comme négatifs (<10), ou positifs ( $\geq 80$  ou  $\geq 640$ ) ou alternativement, positifs avec titre.

Lire la coloration spécifique de la substance intercellulaire de l'épithélium ou de la zone anti-membrane basale. Divers autres anticorps de tissus tels que AAN, mitochondrial, muscle lisse, endomysial, cellule anti-cytoplasmique basale et anticorps anti-cytoplasmiques supérieurs et anticorps pour les muscles striés peuvent aussi être observés sur les sections d'œsophage de singe et de cochon d'Inde<sup>4</sup>. Les sangs donnant la moindre de ces réactions doivent être rapportés comme négatifs pour les anticorps anti-intercellulaires et les antigènes anti-membrane basale. Tous les sangs donnant des réactions de coloration nucléaire peuvent être testés avec des tests anticorps antinucléaires (AAN) (cellules HEp-2) *Catalogue N° 1102 ou 1103*, Tests anticorps antinucléaires (AAN) (sections de foie de souris) *Catalogue N° 1100 ou 1101*. Tous les sangs donnant des réactions de coloration aux muscles lisses ou mitochondriales peuvent être testés sur le système de test auto-anticorps (sections estomac / rein de la souris) *Catalogue N° 1107*.

### LIMITE DE LA PROCÉDURE

Dans certains sangs, les anticorps à la fois intercellulaires et anti-membrane basale peuvent être présents dans des titres différents comme indiqués par différents motifs de coloration. Les motifs d'anticorps et leurs titres doivent être rapportés. Parfois, les sangs peuvent faire preuve d'une forte coloration AAN, anticorps au cytoplasme, et une coloration non-spécifique au niveau de la couche basale ou spinale de l'épithélium. Ils peuvent interférer avec la capacité de détection respectivement des anticorps anti-intercellulaires et anti-membranes basales. Dans de tels cas, le titrage du sang peut permettre la visualisation des anticorps de la peau. Dans d'autres cas, ils peuvent avoir un titre inférieur au AAN ou anticorps cytoplasmiques.

Dans le dernier cas, le sang doit être rapporté comme étant négatif pour les anticorps intercellulaires et anti-membranes basales, mais il doit mentionner que les anticorps de la peau ne peuvent pas être exclus.

Dans les cas comme celui-ci, il est recommandé d'effectuer des biopsies par immunofluorescence directe. Le conjugué FITC IgG anti-humain de chèvre fourni dans ce kit est principalement spécifique aux chaînes lourdes, mais il possède aussi une certaine activité sur les chaînes légères. Il réagit principalement avec les anticorps de la classe IgG, mais il peut, à un moindre degré, réagir avec les chaînes légères des autres classes telles que IgM.

Une réaction d'anticorps anti-membrane basale positive avec un motif linéaire est consistante avec un diagnostic de pemphigoïde (c'est-à-dire pemphigoïde bulleux ou autre forme de pemphigoïde) ou d'épidermolyse bulleuse acquise. La méthode d'immunofluorescence indirecte utilisant ces substrats ne peut pas différencier ces deux maladies.

Une réaction intercellulaire positive n'est pas un diagnostic du pemphigus. De telles réactions peuvent aussi être dues aux anticorps du groupe sanguin ou à des anticorps comme du pemphigus. Il est recommandé que tous les sangs positifs pour les anticorps anti-cellulaires soient absorbés pour différencier les sangs donnant une coloration positive intercellulaire en raison des anticorps du groupe sanguin<sup>3</sup>.

Ainsi, les cliniciens doivent considérer les résultats sanguins avec les résultats cliniques et les autres analyses de laboratoire, notamment l'histopathologie et l'immunofluorescence directe des spécimens des biopsies de la peau, vers le diagnostic du pemphigus ou de la pemphigoïde.

## VALEURS ATTENDUES

Presque tous les patients souffrant de pemphigus possèdent des anticorps intercellulaires. L'utilisation de substrats doubles augmente la sensibilité de détection des anticorps intercellulaires comme indiqué par les données du Tableau 1 à la fin de ce document sur 123 patients souffrant de pemphigus.

En plus de la sensibilité accrue, l'utilisation des substrats des deux tissus permet la différenciation immunologique du pemphigus vulgaire du pemphigus foliacé dans la plupart des cas<sup>4-6</sup>. Comme illustré dans le Tableau 2, les sangs infectés du pemphigus vulgaire donnent généralement des titres plus élevés et/ou une coloration plus vive sur l'œsophage de singe que sur l'œsophage de cochon d'Inde, pendant que l'opposé est vrai pour les sangs infectés par le pemphigus foliacé.

La comparaison des titres des anticorps du pemphigus dans les sangs précédents et actuels de patients avec un diagnostic prouvé de pemphigus fournit des informations de diagnostic précieuses, car les fluctuations dans le titre tendent à être parallèles à l'activité de la maladie comme montré dans la figure 4. Les titres fournissent des informations utiles sur le réglage des doses des agents thérapeutiques ; les patients avec des titres résiduels, mais sans lésion peuvent s'attendre à des rechutes si la thérapie est arrêtée<sup>6</sup>.

Le pourcentage des patients souffrant de pemphigoïde avec des anticorps anti-membrane basale varie en fonction de la forme de la maladie comme montré dans le Tableau 3.

La différenciation des anticorps de l'épidermolyse bulleuse acquise et de la pemphigoïde nécessite des procédures de test spéciales<sup>8-10</sup>. La méthode recommandée est un test d'immunofluorescence indirecte des anticorps anti-membrane basale sur un prélèvement normal de peau avec 1M NaCl<sup>9</sup>. Les titres d'anticorps anti-membrane basale ne sont généralement pas parallèles à l'activité de la maladie comme le font les anticorps du pemphigus.



## REFERENCES • REFERENCIAS • LITERATUR • RIFERIMENTI

1. Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V (Eds) "Immunopathology of the Skin", 3rd Ed, John Wiley and Sons, New York, 1987.
2. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 3-40, 1987.
3. Kumar, V and Beutner EH, Monkey esophagus: A unique antigenic substrate in immunodermatology. In "immunopathology of the skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 65-89, 1987.
4. Sabolinski, ML, Beutner EH, Krasny S, Kumar V and Chorzelski TP. Substrate specificity of anti-epithelial antibodies of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera in immunofluorescence tests on monkey and guinea pig esophagus sections. *J Invest Dermatol* 88: 545-549, 1987.
5. Beutner EH, Sabolinski ML, Huang J, Krasny SA, Kumar V and Chorzelski TP. Indirect immunofluorescent differentiation of autoantibodies of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 86: 463, 1986.
6. Krasny S, Beutner EH and Chorzelski TP. Specificity and sensitivity of indirect and direct immunofluorescence findings in the diagnosis of pemphigus. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 207-247, 1987.
7. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories Centers for Disease Control, National Institutes of Health, (HHS Pub. No{CDC} 93-8395) 1999.
8. Gammon WR, Wilson BD and Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 383-398, 1987.
9. Medenicamojslovic L, Fenske W and Espinoza C. Epidermolysis bullosa acquisita -direct immunofluorescence and ultrastructural studies. *Am J Dermatopathol* 9: 324333, 1987.
10. Gammon WR, Kowalewski C, Chorzelski TP, Kumar V, Briggaman RA and Beutner EH. Direct immunofluorescence on sodium chloride-separated skin in the differential diagnosis of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatology*, 1989.

**IC staining for IgG in Pemphigus**

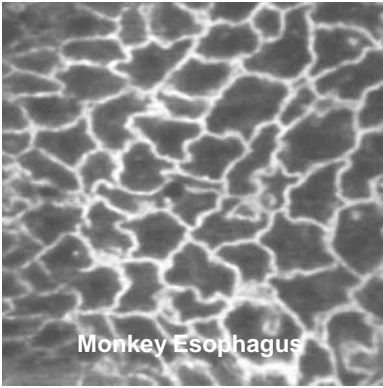


Figure 1

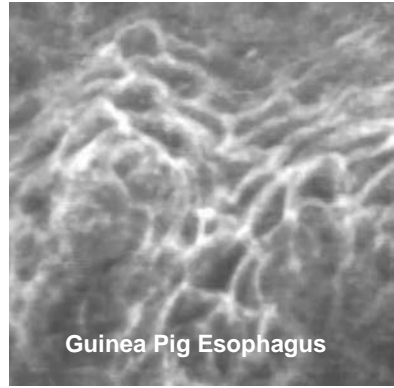


Figure 2

**BMZ staining for IgG in Pemphigoid**

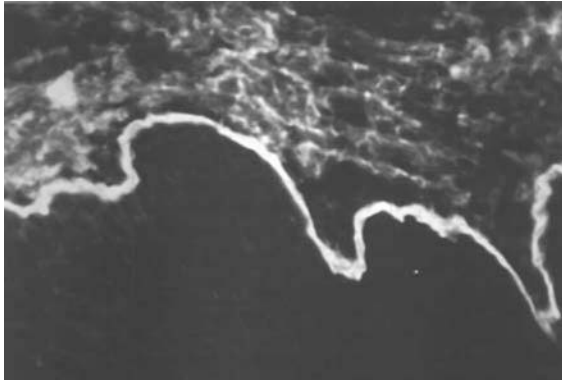


Figure 3

**Table 1: Sensitivity of Indirect Immunofluorescence Test for Antibodies On Different Substrates**

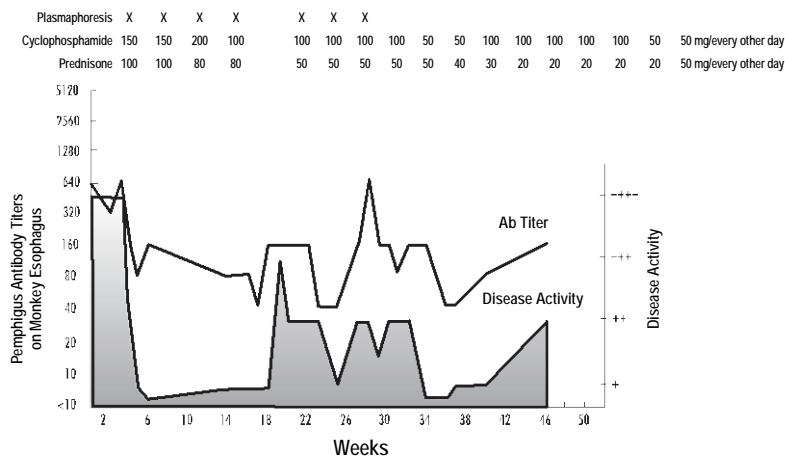
Tested on	Negative	Positive	% Positive
Monkey Esophagus alone	12	111	89
Guinea Pig Esophagus alone	20	103	81
Together	1	122	99

**Table 2: Differentiation of Pemphigus Vulgaris from Pemphigus Foliaceus by Indirect Immunofluorescence Test**

Higher Titer and/or Brighter Staining on:	P. Vulgaris Sera	P. Foliaceus Sera
Monkey Esophagus	73	0
Guinea Pig Esophagus	0	25
No Difference	2	5

**Figure 4: Pemphigus Antibody Titers and Disease Activity**

Reprinted with permission from: Krasny S, Beutner EH and Chorzelski TP<sup>6</sup>



**Table 3: Incidence of Basement Membrane Antibodies Detected by Indirect Immunofluorescence on Monkey Esophagus Substrate**

Clinical Condition	% Positive
Bullous Pemphigoid	70
Cicatrical Pemphigoid and Brunsting-Perry Variant	10
Vesicular Pemphigoid	50
Epidermolysis Bullosa Acquisita	50
Normal Controls	0

**Table 4: Comparisons of Kits Using Monkey/Guinea Pig Esophagus vs. Monkey Esophagus Substrate Alone for the Detection of Anti-IC and Anti-BMZ Antibodies by Indirect Immunofluorescence**

Clinical Condition	No. of Sera	% Positive		
		IMMCO Monkey Esophagus	Guinea Pig Esophagus	OTHER Monkey Esophagus
Pemphigus Vulgaris	10	100/100	5/50	2/20
Pemphigus Foliaceus	10	6/60	10/100	3/30
Pemphigoid/ EBA	20	20/100	ND	17/85
Normal Controls	38	4*/11	0	0

EBA = Epidermolysis bullosa acquisita

ND = Not Done

\*These four sera upon treatment with absorbent were negative for intercellular staining on monkey esophagus sections due to blood group antibodies.



*For technical assistance please contact:*



**IMMCO Diagnostics, Inc.**

**60 Pineview Drive**

**Buffalo, NY 14228-2120 USA**

**Telephone: (716) 691-0091**

**Fax: (716) 691-0466**

**Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST**

**E-Mail: [info@immcodiagnostics.com](mailto:info@immcodiagnostics.com)**

*or your local product distributor*



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante  
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Europe

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)