



Immuglo™ Anti-Skin Antibody (IC/BMZ) Test System Monkey Esophagus Sections

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

CLIA Complexity: High
CDC Analyte Identification Code: 0449
CDC Test System Identification Code: 28313

REF Code: 1105 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)¹. Epithelial intercellular antibodies are diagnostic for pemphigus and occur in over 90% of sera from all active forms. 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.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

In the indirect immunofluorescence method used in this kit, patients' sera are incubated on monkey 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 dilutions².

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: 1105 48 determinations

8 x	SORB SLD 6	6 well Substrate Slides, Monkey Esophagus
1 x 0.5 ml	CONTROL + IC *	Anti-IC Positive Control. Contains human serum.
1 x 0.5 ml	CONTROL + BMZ *	Anti-BMZ Positive Control. Contains human serum.
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	CONJ FITC *	Anti-human FITC Conjugate. Protect from light.
1 x 5 ml	CONJ FITC EB *†	Anti-human FITC Conjugate containing Evan's Blue. Protect from light.

1 x 60 ml	BUF *	Buffered Diluent.
2 vials	BUF WASH	Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Mounting Medium. Do not freeze.
1 x 1.0 ml	EVANS	Evan's Blue Counterstain.
1 x 12	COVER SLD	Coverslips.

* Contains < 0.1% NaN₃

† 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, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials³.

WARNING - Sodium azide (NaN₃) 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 provided (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 μ l) 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 μ l) 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, ≥ 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 (≥ 80 or ≥ 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 sections⁴. 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*.

LIMITATIONS 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 or upper cytoplasmic or basal cell cytoplasmic antibodies. 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 antibodies⁴.

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

About 90% of pemphigus patients have anti-IC antibodies. 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 3. 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 withdrawn⁷.

The percentage of pemphigoid patients with anti-basement membrane antibodies varies with the form of the disease as shown by table 1.

Differentiation of the antibodies of epidermolysis bullosa acquisita (EBA) and pemphigoid requires special test procedures⁸⁻¹⁰. The recommended method is an indirect immunofluorescence test of basement membrane antibodies on normal skin split with 1M NaCl⁹. Titers of basement membrane antibodies usually do not parallel disease activity as do pemphigus antibodies.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sera obtained from 38 normal subjects, 10 confirmed cases of pemphigus vulgaris, 10 confirmed cases of pemphigus foliaceus and 20 confirmed cases of pemphigoid or epidermolysis bullosa acquisita were tested on this kit and another commercially available skin antibody kit. Sera were tested according to the procedures recommended by the manufacturers. Results using the Immuglo™ Anti-Skin Antibody (IC/BMZ) Test System showed increased sensitivity as well as comparable specificity. See table 2.



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



REF Code: 1105 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, pemphigoid cicatricial, y el epidermolysis bullosa adquirita (EBA) ¹. Los anticuerpos intercelulares epiteliales son de diagnóstico para el pemphigus y ocurren adentro sobre el 90% de sueros de todas las formas activas. 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.

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 para permitir atar de anticuerpos al sustrato. 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 seriales².

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: 1105 48 determinations

8 x	SORB SLD 6	Portaobjetos de 6 pocillos , esófago del primate
1 x 0.5 ml	CONTROL + IC *	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.
1 x 5 ml	CONJ FITC *	Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti humana . Proteger de la luz.

1 x 5 ml	CONJ FITC EB *†	Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti humana con azul de Evans. Proteger de la 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 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Medio de preparación. No congelar.
1 x 1.0 ml	EVANS	Colorante de contraste azul de Evans.
1 x 12	COVER SLD	Cubreobjetos.

* PRECAUCIÓN - Contiene < 0.1% NaN₃

† 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 material²².

PRECAUCIÓN - La azida sódica (NaN₃) 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 ingiere. 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 µl de suero + 90µl 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 substrato se equilibren a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraer con cuidado los portaobjetos sin tocar el substrato.
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 antidesfibrinación, 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 dilución 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 doblez 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 dilución 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 $8 \pm$ 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 (≥ 80 o ≥ 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 ⁴. 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. Los sueros pueden exhibir de vez en cuando mancharse fuerte para ANA o los anticuerpos citoplásmicos superiores o la célula básica citoplásmica. 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 ⁴.

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 pemphigoid o del pemphigus.

VALORES PREVISTOS

Los cerca de 90% de pacientes del pemphigus tienen anticuerpos anti-IC. 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 3. 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 ⁷.

El porcentaje de los pacientes del pemphigoid con los anticuerpos anti-BMZ varía con la forma de la enfermedad según lo demostrado en Table 1.

La diferenciación de los anticuerpos del (EBA) y del pemphigoid requiere métodos de prueba especiales ⁸⁻¹⁰. El método recomendado es una prueba indirecta de la inmunofluorescencia de los anticuerpos BMZ en la piel normal partida con NaCl del 1M⁹. 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 2).



ImmuGlo™ Anti-Pelle Anticorpo (IC/BMZ) Sistema Substrato di primate esofago



REF Code: 1105 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)¹. Gli anticorpi intercellulari epiteliali sono diagnostici per il penfigo e si presentano dentro più di 90% dei sieri da tutti gli interventi concreti. 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.

PRINCIPIO DEL METODO

Nella metodica in immunofluorescenza indiretta utilizzata in questo kit, i sieri dei pazienti vengono incubati su primate esofago per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Tutti gli anticorpi non legati vengono eliminati sciacquando 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).²

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

ImmuGlo™ Anti-Pelle Anticorpo (IC/BMZ) IFA **REF** 1105

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

8 x	SORB SLD 6	Vetrini-substrato di primate esofago con 6 pozzetti
1 x 0,5 ml	CONTROL + IC *	Controllo positivo anti-IC, siero umano con BSA
1 x 0,5 ml	CONTROL + BMZ *	Controllo positivo anti-BMZ, siero umano con BSA
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Controllo negativo, siero umano con BSA
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Coniugato FITC anti-IgG umana con BSA. Tenere lontano dalla luce.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB *†	Coniugato FITC anti-IgG umana con Evan's Blue. Tenere lontano dalla luce.

1 x 60 ml	BUF *	Diluyente per campioni con BSA
2 x	BUF WASH	Tampone fosfato-salino (PBS). Ricostituire ciascun flaconcino con 1 litro d'acqua
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Mezzo Montante. Non congelare.
1 x 1,0 ml	EVANS	Blu di Evans
1 x 12	COVER SLD	Vetrini coprioggetto

* Contiene < 0.1% NaN₃

† Sostituisce il coniugato senza Blu di Evans nei numeri di codice che contengono "EB"

Materiali necessari ma non forniti

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 materiali¹⁴. **ATTENZIONE** - La sodio azide (NaN₃) 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.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare soltanto campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o contaminati possono influenzare i risultati del test e vanno scartati. Conservare i campioni a una temperatura di 2-8°C per non oltre una settimana. Per periodi di conservazione più lunghi, congelare il siero a -20°C, evitando di congelare i campioni più volte.

PROCEDURA

Metodica d'analisi

A. Screening

1. Diluire ciascun siero di paziente 1:10 con il Diluyente per Campioni fornito (10 µl di siero + 90 µl di Diluyente). **Non diluire i Controlli Positivi o Negativi**. Conservare i sieri non diluiti per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
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
Siero	0.1 ml			
	+			
Diluente tamponato	0.9 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
		↻	↻	↻
Trasferimento		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Diluizione finale	1:10	1:20	1:40	1:80etc.

CONTROLLO DI QUALITA'

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 ± 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'esofago⁴. 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 i reazioni forti per ANA, gli anticorpi citoplasmici superiori o gli anticorpi di cellule basali citoplasmici. 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 sanguigno⁴. 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

Circa 90% dei pazienti di penfigo hanno anticorpi di IC. 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 3. 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 ritirata⁷. La percentuale dei pazienti del penfigoid con gli anticorpi della BMZ varia con la forma della malattia come indicata dalla tabella 1.

La differenziazione degli anticorpi del EBA e del penfigoid richiede i metodi di prova speciali⁸⁻¹⁰. Il metodo suggerito è una prova di immunofluorescenza indiretta degli anticorpi della BMZ su pelle normale spaccata con il 1M NaCl⁹. 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 2.

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. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories Centers for Disease Control, National Institutes of Health, (HHS Pub. No{CDC} 93-8395) 1999.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
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. Medicamojslovic L, Fenske W and Espinoza C. Epidermolysis bullosa acquisita - direct immunofluorescence and ultrastructural studies. *Am J Dermatopathol* 9: 324-333, 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

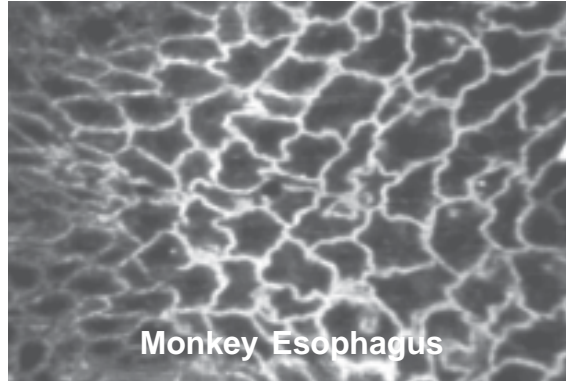


Figure 1

BMZ staining for IgG in Pemphigoid

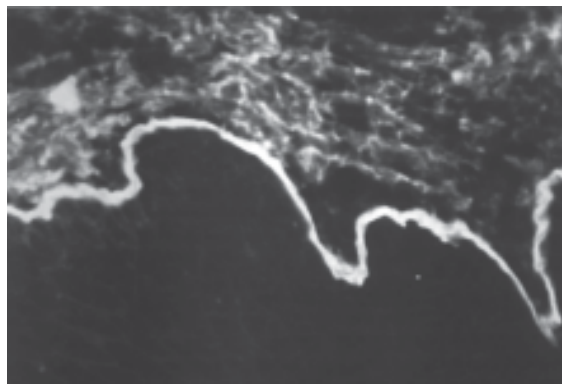


Figure 2

NOTES:

For technical assistance please contact:



IMMCO Diagnostics, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé
EMERGO Group, Inc.
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com

REV. MAY2009

Document No. PI4109CE