



ImmuGlo™ Anti-Reticulin Antibody (ARA) Test System

For *in vitro* diagnostic use **IVD**

CLIA Complexity: High
CDC Analyte Identification Code: 0444
CDC Test System Identification Code: 28331

PRODUCT INSERT

Code 1115

48 Determinations

INTENDED USE

An indirect immunofluorescence antibody test for the detection and semi-quantitation of anti-reticulin antibodies (ARA) in human serum.

SUMMARY AND EXPLANATION

The detection of anti-reticulin antibodies (ARA) is performed primarily by indirect immunofluorescence. ARA was first described by Seah et al.^{1,2} in 1971 in the sera of patients with gluten sensitive enteropathy: celiac disease (CD) or dermatitis herpetiformis (DH). In 1973 Rizzetto and Doniach³ identified five different ARA reaction patterns. Of these, the R1 pattern, characterized by peri-glomerular, peri-tubular, and peri-vascular staining of mouse or rat kidney is associated with gluten sensitive enteropathy. Both IgG and IgA immunoglobulin class ARA occur. The IgA class ARA is the more specific and sensitive marker of gluten sensitive enteropathy. The specificity of IgA-ARA has been reported to be 59-100% and its sensitivity between 30-95%¹⁻¹¹. IgG-ARA occur less frequently, either in conjunction with IgA class ARA or in CD patients who are IgA deficient¹¹.

PRINCIPLES OF PROCEDURES

In the indirect immunofluorescence method, patient serum is incubated on tissue sections to allow binding of antibodies to the substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgA and IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled, anti-human immunoglobulin conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of ARA is demonstrated by an apple green fluorescence of the peri-tubular, peri-glomerular and peri-vascular fibers of the kidney. The titer (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) of the antibody is then determined by testing serial dilutions.

PRODUCT INFORMATION

Storage and Preparation

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

Materials Provided

Kits contain sufficient reagents to perform 48 determinations each.

8 x	SORB SLD	6 well Rat Kidney Substrate Slides
1 x 0.5 ml	CONTROL + ARA *	ARA Positive Control. Contains human serum.
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC *	Anti-human polyvalent FITC Conjugate. Protect from light.
1 x 60 ml	BUF *	Sample 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% NaN ₃		

Materials 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 materials¹³.

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 HANDLING

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 1:2.5 with the Sample Diluent provided (0.2 ml serum + 0.3 ml 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)₃

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 Positive and Negative Controls. Make serial two-fold dilutions starting at 1:2.5. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

Preparation of Serial Dilutions

Number four tubes 1 through 4. Add 0.3 ml of Buffered Diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 4. Pipette 0.2 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
Serum	0.2 ml +			
Buffered Diluent	0.3 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Transfer		↗ 0.2 ml	↗ 0.2 ml	↗ 0.2 ml
Final dilution	1:2.5	1:5	1:10	1:20 etc.

QUALITY CONTROL

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run. The Negative Control should show no specific fluorescence of the peri-nuclear, peri-glomerular and peri-vascular reticulin fibers, whereas the Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of the tubules of these structures.

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, bulb beyond useful life expectancy, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.

RESULTS

The results of the tests for ARA should be reported as negative (<2.5), positive greater or equal to 20, or preferably, positive with titer.

Read for specific peri-glomerular, peri-tubular and peri-vascular reticulin fiber staining. Other detectable antibodies include anti-smooth muscle antibodies (ASMA), antinuclear antibodies (ANA) and anti-mitochondrial antibodies (AMA).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

In some cases, sera positive for ARA may either be very weak or negative at the initial screening dilution (prozone phenomenon). In such doubtful cases the sera should be screened at higher dilutions and, if positive, antibody titer determined.

The presence of two or more antibodies in a serum which are reactive with the same tissue may cause an interference in their detection by immunofluorescence. This interference may cause either a failure to detect ARA or a suppression of its titer if the interfering antibody has a higher titer than ARA. The most common cause of the interference phenomenon in ARA tests is the coexistence of ASMA. It is recommended that patients sera which also contain ASMA be

tested further at higher dilutions.

In some patients with CD and DH, ARA tests may be negative. In such cases repeat testing may yield additional positive results. A negative test for ARA does not rule out a diagnosis of GSE. CD and DH patients on a gluten free diet may have low ARA titers or even be negative.

In some patients with celiac disease and IgA deficiency, the IgA-class ARA antibodies are absent. However, such patients are usually positive for IgG class ARA.

EXPECTED VALUES

As seen in Table 1 at the end of this document, ARA are highly specific markers for GSE. The presence of ARA seems to be related to the intestinal pathology both in celiac disease and dermatitis herpetiformis rather than to the skin lesions in the latter.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The ImmuGlo™ Anti-Reticulin Antibody (ARA) Test kit was compared with another commercially available kit using a polyvalent conjugate and primate smooth muscle as a substrate. The comparison included a total of 100 sera: 50 from patients with clinically suspected celiac disease and 50 from normal controls. Sera were tested according to the procedure recommended by the manufacturer. The results were as follows:

		IMMCO ARA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other/Autre/Otro	POS (+)	43	7	50
Andere/Altro/Otra	NEG (-)	0	50	50
ARA IFA	TOT (=)	43	57	100

relative specificity/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa: 93%
relative sensitivity/sensibilidad relativa/relative Sensitivität/sensibilità relativa/sensibilidade relativa: 86%
relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo: 100%



ImmGlo™ ANTICORPI ANTI-RETICULINA (ARA)

REF

Catalogo no. 1115

IMMCO
DIAGNOSTICS

IVD

Una prova indiretta immunofluorescenza per la rilevazione e la semi-quantificazione degli anticorpi di anti-reticulina (ARA) in siero umano.

CARATTERISTICHE GENERALI

La rilevazione degli anticorpi di anti-reticulina (ARA) è realizzata soprattutto dall'immunofluorescenza indiretta. ARA in primo luogo è stato descritto da Seah ed altri^{1,2} di 1971 nei sieri dei pazienti con enteropatia sensibile del glutine (GSE): la malattia celiaca (CD) o la dermatite erpetiforme (DH). In 1973 Rizzetto e Doniach³ hanno identificato cinque modelli differenti di reazione di ARA. Di questi, il modello R1, caratterizzato dalla macchiatura peri-glomerulare, peri-tubolare e peri-vascolare del rene del ratto o del mouse è associato con GSE. Sia gli ARA dell'immunoglobulina di IgA che di IgG accade. Gli ARA di IgA è l'indicatore più specifico e più sensibile di GSE. La specificità di IgA-ARA è stata segnalata per essere 59-100% e la relativa sensibilità fra 30-95%¹⁻¹¹. IgG-ARA si presenta frequentemente di meno, insieme con ARA di IgA o nei pazienti del CD che sono IgA carenti¹¹.

PRINCIPIO DEL METODO

Nella metodica in immunofluorescenza indiretta utilizzata in questo kit, i sieri dei pazienti vengono incubati su sezioni del tessuto per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Tutti gli anticorpi non legati vengono eliminati sciacquando il vetrino, mentre gli anticorpi legati vengono individuati mediante incubazione del substrato con coniugato anti umana, marcato con fluoresceina. Per osservare le reazioni si utilizza un microscopio a fluorescenza dotato di filtri adatti. Una fluorescenza verde mela delle fibre peri-tubolari, peri-glomerulari e peri-vascolare del rene conferma la presenza di ARA. Mediante l'analisi di diluizioni seriali si determina quindi il titolo (il reciproco della diluizione più elevata che causa una reazione positiva).

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

ImmGlo™ ARA IFA REF 1115

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

8 x	SORB SLD 6	Vetrini-substrato di rene del ratto con 6 pozzetti
1 x 0,5 ml	CONTROL + ARA *	Controllo positivo ARA , siero umano
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Controllo negativo , siero umano
1 x 5 ml	IgA/IgG-CONJ FITC *	Coniugato FITC anti-umana . Tenere lontano dalla luce.
1 x 60 ml	BUF *	Diluyente per campioni
2 flaconcini	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

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 materiali¹³. 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 1:2,5 con il Diluente per Campioni fornito (20 μl di siero + 0,3 ml di Diluente). **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 aumentare la fluorescenza della priorità bassa.
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 $2-8^{\circ}\text{C}$.

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 1:2,5. 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 0,3 ml di Diluente per Campioni alla provetta 1 e 0,2 ml alle provette da 2 a 4. Pipettare 0,2 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	0,2 ml			
	+			
Diluente tamponato	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻
Trasferimento		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluizione finale	1:2,5	1:5	1:10	1:20 etc.

CONTROLLO DI QUALITA'

Ciascuna sessione analitica deve comprendere sia un Controllo Positivo che uno Negativo. Il Controllo Negativo non deve mostrare alcuna fluorescenza specifica delle fibre perinucleari, peri-glomerulari e peri-vascolare di reticolina, mentre il Controllo Positivo deve avere un'intensità di colorazione dei tubi di queste strutture di almeno 2+ con il controllo positivo ARA.

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.

RISULTATI

I risultati delle prove per ARA dovrebbero essere segnalati come negativo (< 2.5), positivo (più grande o uguale a 40), o alternativamente, positivo con il titolo.

Colto per la macchiatura peri-glomerulare, peri-tubolare e peri-vascular specifica della fibra di reticolina.

Altri anticorpi rilevabili includono gli anticorpi antinucleari (ANA), gli anticorpi anti-lisci del muscolo (ASMA) e gli anticorpi anti-mitochondriali (AMA).

LIMITI DELLA PROCEDURA

In alcuni casi, i sieri ARA positivi possono essere o molto deboli o negativi alla diluizione iniziale di screening (fenomeno di prozona). Quando si verificano questi casi dubbi, i sieri dovranno essere esaminati a diluizioni maggiori e, se positivi, dovranno essere determinati i titoli anticorpali.

In alcuni casi la presenza in un siero di due o più anticorpi reattivi con lo stesso substrato può causare un'interferenza nella loro individuazione mediante immunofluorescenza. Tale interferenza può provocare il mancato rilevamento degli ARA o la soppressione del loro titolo se gli anticorpi che interferiscono hanno un titolo maggiore degli ARA.

La causa più comune del fenomeno d'interferenza nei test ARA è la coesistenza degli ASMA. I sieri che contengono la ASMA deve essere esaminata ancora alle più alte diluzioni. In alcuni pazienti con il CD ed il DH, le prove di ARA possono essere negative. In tali casi la prova di ripetizione può dare i risultati positivi supplementari. Una prova negativa per ARA non elimina una diagnosi di GSE. CD ed i pazienti del DH su un glutine stanno liberamente possono avere titoli bassi di ARA o persino essere negativi. In alcuni pazienti con la malattia celiaca e la mancanza di IgA, gli anticorpi ARA del IgA sono assenti. Tuttavia, tali pazienti sono solitamente positivi per ARA di IgG.

VALORI ATTESI

Come visto in Table 1 (all'estremità di questo documento), ARA sono altamente specifici per il CD ed il DH. La presenza di ARA sembra essere collegata con la patologia intestinale sia in CD che DH piuttosto che alle lesioni cutanee nel posteriore.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL METODO

Il corredo di ImmuGlo ARA è stato paragonato ad un altro corredo disponibile in commercio. Il confronto ha incluso un totale di 100 sieri: 50 dai pazienti con ritenuto sospetto del CD e 50 dai controlli normali. I risultati seguono.

		IMMCO ARA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other/Autre/Otro	POS (+)	43	7	50
Andere/Altro/Otra	NEG (-)	0	50	50
EMA IFA	TOT (=)	43	57	100

relative specificity/specificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa:	93%
relative sensitivity/sensibilité relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivität/sensibilità relativa/sensibilidade relativa:	86%
relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo:	96%

REFERENCES • REFERENCIAS • LITERATUR • RIFERIMENTI

1. Seah PP, Fry L, Hoffbrand AV and Holborow EJ. Tissue antibodies in dermatitis herpetiformis and adult celiac disease. *Lancet*; 1971, 1:834-836.
2. Seah PP, Fry L, Holborow EJ, et. al. Anti-reticulin antibody. Incidence and diagnostic significance. *Gut*; 1973, 14:311-315.
3. Rizzetto M and Doniach D. Types of "reticulin" antibodies detected in human sera by immunofluorescence. *J Clin Path*, 1973, 26:841-851.
4. Khoshoo V, Bhan MK, Unsworth DJ, Kumar R and Walker-Smith JA. Anti-reticulin antibodies: useful adjunct to histopathology in diagnosing celiac disease, especially in a developing country. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 1988, 7:864-866.
5. Kumar V, Hemedinger E, Chorzelski TP, Beutner EH, Valeski JE and Kowalewski C. Reticulin and endomysial antibodies in bullous diseases-comparison of specificity and sensitivity. *Arch Dermatol*; 1987, 123:1179-1182.
6. Lancaster-Smith M, Kumar P, Clark ML, Marks R and Johnson GD. Anti-reticulin antibodies in dermatitis herpetiformis and adult celiac disease. Their relationship to a gluten free diet and jejunal histology. *Br J Dermatol*; 1975, 92:37-42.
7. Ljunghall K, Scheynius A, Jonsson J, Schilling W and Forsum U. Gluten-free diet in patients with dermatitis herpetiformis. Effect on the occurrence of antibodies to reticulin and gluten. *Arch Dermatol*; 1983, 119:970-974.
8. Rossi TM, Kumar V, Lerner A, Heitlinger LA, Tucker N and Fisher J. Relationship of endomysial antibodies to jejunal mucosal pathology: specificity towards both symptomatic and asymptomatic celiacs. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr*; 1988, 7:858-863.
9. Vainio E, Kosnai I, Hallstom O, Karpati S, Maki M and Reunala T. Antigliadin and antireticulin antibodies in children with dermatitis herpetiformis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 1986, 51:375-379.
10. Hallström O. Comparison of IgA-class reticulin and endomysium antibodies in celiac disease and dermatitis herpetiformis. *Gut*; 1989, 30:1225-1232.
11. Kumar V, Lerner A, Valeski JE, Beutner EM, Chorzelski TP and Kowalewski C. Relative sensitivity and specificity of serodiagnostic tests to gluten sensitive enteropathy. A comparative studies on IgA class endomysial (IgA-EMA) and IgA-class anti-reticulin antibodies (IgA-ARA) in celiac disease. In "Serologic Diagnosis of Celiac Disease", Chorzelski TP, Beutner EH, Kumar V and Zalewski TK, Eds, CRC Press, Boca Raton; 1990, 127-136.
12. 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; 1987, 3rd Ed, 3-40.
13. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories Centers for Disease Control, National Institutes of Health; 1999, (HHS Pub. No{CDC} 93-8395).

**Photo 1. Positive ARA staining reaction on rat kidney, 200X.
Note staining of the reticulin fiber.**

Photo 2. Negative ARA staining reaction.

Table 1. Incidence of ARA

Clinical Condition	No. Pos/Total	% Positive
Confirmed Celiacs		
On Gluten	32/38	84
On GFD	4/37	11
Suspected Celiacs		
On Gluten	18/30	60
On GFD	2/30	7
Dermatitis Herpetiformis	19/54	35
Family Member of CD	2/76	3
Disease Controls		
Ulcerative Colitis	0/11	0
Crohn's Disease	0/74	0
Pemphigus	0/38	0
Pemphigoid	0/60	0
Blood Donors	0/113	0

GFD = Gluten Free Diet; adapted from Kumar et al. ¹¹

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

IMMCO
DIAGNOSTICS

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. PI4115CE