

NOVA Lite[®] Monkey Oesophagus IFA Kit/Slides

Pour usage diagnostique *In Vitro*.

Complexité CLIA : élevée



REF

704145, 704150, 704155,
504145, 504145.10, 504150, 504150.25,
504155.25

Rx Only

Utilisation prévue

Les coupes d'œsophage de singe sont utilisées comme substrat pour le dépistage d'anticorps anti-antigènes intra-épidermiques ou anti-membrane basale dans le sérum humain, pour faciliter le diagnostic respectivement du pemphigus et du pemphigoïde bulleux. Elles peuvent également servir à la détection d'anticorps anti-endomysium, pour faciliter le diagnostic de la maladie coéliquae.

Résumé et explication du test

Les anticorps IgG intra-épidermiques qui caractérisent diverses formes cliniques de pemphigus réagissent avec les antigènes présents à la surface des kératinocytes épidermiques. Un résultat positif produit un profil en « grillage » caractéristique. Un dépôt d'immunoglobuline sur le tissu se produit dans la plupart des cas. En cas de maladie bulleuse, il est recommandé de toujours mener des recherches sur le sérum de patient et le tissu. Les anticorps anti-membrane basale sont généralement présents en cas de pemphigoïde bulleux. Pour cette pathologie, la biopsie fait apparaître un dépôt linéaire d'IgG et de C3 le long de la jonction dermo-épidermique. Ces auto-anticorps sont souvent présents dans le sérum des patients concernés, mais pas toujours. Cependant, le titrage des anticorps n'est pas corrélé à l'état pathologique et des anticorps peuvent toujours être présents dans les tissus et le sérum en cas de rémission clinique. Un conjugué IgG anti-humain - FITC (H&L) est fourni dans cette trousse pour rechercher ces deux auto-anticorps. Les anticorps anti-endomysium sont dirigés contre les fibres ayant l'aspect de la réticuline dans le tissu conjonctif, autour des fibres du muscle lisse des voies intestinales de primates. Une sensibilité et une spécificité de près de 100 % ont été reportées pour les anticorps anti-endomysium de classe IgA actifs dans la maladie coéliquae^{1,2}. Ces anticorps sont détectés par le conjugué IgA anti-humain - FITC fourni.

Principes du test

Cette trousse utilise une technique d'immunofluorescence indirecte³ pour l'incubation des échantillons de patient et des contrôles appropriés avec les coupes. Les anticorps n'ayant pas réagi sont lavés, puis le conjugué marqué à la fluorescéine qui convient est appliqué. Le conjugué non lié est lavé comme précédemment. Les lames sont examinées au microscope à fluorescence et les échantillons positifs présentent une fluorescence vert pomme dans les zones où l'auto-anticorps s'est lié.

Réactifs

1. Coupes d'œsophage de singe sur des lames à 5 ou 10 puits, avec dessiccateur.

Trousses 704145 et 704150 :

1. Deux sérums de contrôle positifs (provenant de sérum humain), l'un donnant un aspect « treillis métallique » au pemphigus et l'autre, un aspect « réticuline » à l'endomysium sur des coupes d'œsophage de singe contenant 0,09 % d'azoture de sodium. **Prédilués, prêts à l'emploi.**
2. Sérum de contrôle négatif, universellement négatif pour tous les auto-anticorps, contenant 0,09 % d'azoture de sodium. **Prédilué, prêt à l'emploi.**
3. Solution saline tamponnée au phosphate (PBS II) concentrée 40 fois.
4. Conjugué IgG anti-humain de mouton purifié par affinité (H+L) - fluorescéine (adsorbée sur singe) et conjugué IgA anti-humain - fluorescéine, contenant 0,09 % d'azoture de sodium. **Prédilués, prêts à l'emploi.**
5. Bleu d'Evans à 1 % comme contre-colorant (facultatif).
6. Support pour préparations microscopiques contenant un agent anti-décoloration.
7. Lamelles.

Trousse 704155 uniquement :

1. Sérums de contrôle positifs (provenant de sérum humain) donnant un aspect « réticuline » à l'endomysium sur des coupes d'œsophage de singe, contenant 0,09 % d'azoture de sodium. **Prédilués, prêts à l'emploi.**
2. Sérum de contrôle négatif, universellement négatif pour tous les auto-anticorps, contenant 0,09 % d'azoture de sodium. **Prédilué, prêt à l'emploi.**
3. Solution saline tamponnée au phosphate (PBS II) concentrée 40 fois.
4. Conjugué IgA anti-humain - fluorescéine, contenant 0,09 % d'azoture de sodium. **Prédilués, prêts à l'emploi.**
5. Bleu d'Evans à 1 % comme contre-colorant (facultatif).
6. Support pour préparations microscopiques contenant un agent anti-décoloration.
7. Lamelles.

Avertissements/Précautions

Le sérum humain fourni par tous les donneurs (trousses uniquement) a été testé et s'est avéré négatif pour l'antigène de surface de l'hépatite B et pour les anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH 1 et 2). Cependant, ces tests ne permettent pas de garantir l'absence d'agents infectieux. Comme pour toutes les substances potentiellement infectieuses, des méthodes de manipulation et d'élimination appropriées doivent être établies et seul un personnel correctement formé à ces méthodes doit être autorisé à effectuer les procédures. Le Bleu d'Evans et les contrôles de la trousse contiennent de l'azoture de sodium à 0,09 % comme conservateur et doivent être manipulés avec précaution : ne pas les ingérer ni les placer en contact avec la peau ou les membranes muqueuses. En cas de contact, laver abondamment à l'eau et consulter un médecin. Des azides métalliques explosifs sont susceptibles de se former avec le plomb et le cuivre des canalisations ; lors de l'élimination du réactif, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azoture. Ce produit ne doit être utilisé que par des personnes convenablement formées aux fins énoncées. Il est recommandé de respecter la procédure indiquée.

Conditions de conservation

Les trousses non ouvertes doivent être conservées entre 2 et 8 °C et peuvent être utilisées jusqu'à la date de péremption indiquée. NE PAS CONGELER. Une fois les plaques retirées d'un sachet, elles doivent être utilisées immédiatement. Le tampon PBS II dilué peut être conservé jusqu'à un mois entre 2 et 8 °C. Tous les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C.

Prélèvement des échantillons

Les échantillons de sang doivent être prélevés par ponction veineuse, un caillot doit se former naturellement et le sérum doit être séparé aussi vite que possible pour éviter une hémolyse. Le sérum peut être conservé jusqu'à 7 jours avant le test entre 2 et 8 °C ou, pour une conservation prolongée, aliquoté et conservé à -20 °C ou une température inférieure⁸. NE PAS congeler et décongeler les sérums plusieurs fois. Éviter d'utiliser des sérums lipémiques, hémolysés ou contaminés par voie microbienne car les titres risquent d'être diminués ou les profils de coloration peu clairs.

Mode opératoire

Matériel fourni (trousses)

704145

1. 10 x Monkey Oesophagus Slide (5 well)
2. 1 x 1mL Pemphigus Positive , prédilué
3. 1 x 1mL Endomysial (Celiac) Positive, prédilué
4. 1 x 1mL IFA System Negative Control, prédilué
5. 1 x 7mL FITC IgG (H&L) Monkey Adsorbed Conjugate
6. 1 x 7mL Anti-Human IgA (α) AFF FITC
7. 1 x 3mL 1% Evans Blue
8. 2 x 25mL PBS II Concentrate (40x)
9. 1 x 3mL Mounting Medium
10. 10 x Coverslips

704150

1. 25 x Monkey Oesophagus Slide (10 well)
2. 1 x 1mL Pemphigus Positive, prédilué
3. 1 x 1mL Endomysial (Celiac) Positive, prédilué
4. 1 x 1mL IFA System Negative Control, prédilué
5. 1 x 15mL FITC IgG (H&L) Monkey Adsorbed Conjugate
6. 1 x 15mL Anti-Human IgA (α) AFF FITC
7. 1 x 3mL 1% Evans Blue
8. 2 x 25mL PBS II Concentrate (40x)
9. 1 x 10mL Mounting Medium
10. 25 x Coverslips

704155

1. 25 x Monkey Oesophagus Slide (10 well)
2. 1 x 1mL Endomysial (Celiac) Positive, prédilué
3. 1 x 1mL IFA System Negative Control, prédilué
4. 2 x 15mL Anti-Human IgA (α) AFF FITC
5. 1 x 3mL 1% Evans Blue
6. 2 x 25mL PBS II Concentrate (40x)
7. 1 x 10mL Mounting Medium
8. 25 x Coverslips

Matériel fourni (lames)

504145	1 x Monkey Oesophagus Slide (5 well)
504145.10	10 x Monkey Oesophagus Slide (5 well)
504150	1 x Monkey Oesophagus Slide (10 well)
504150.25	25 x Monkey Oesophagus Slide (10 well)
504155.25	25 x Monkey Oesophagus Slide (10 well)

Matériel supplémentaire requis mais non fourni

Eau distillée ou désionisée pour diluer le concentré de PBS II

Récipient pour tampon PBS II

Micropipettes et embouts jetables pour la distribution des échantillons de patients

Chambre humide pour les étapes d'incubation

Microscope à fluorescence avec filtre d'excitation à 495 nm et filtre d'émission à 515 nm

Pissette en plastique pour lavage initial au PBS II

Des composants supplémentaires peuvent être obtenus auprès d'Inova Diagnostics : PBS II Concentrate (40x) (508998), IFA System Negative Control (508186), Pemphigus Positive (504051), Pemphigoid Positive Control (504055), Endomysial Positive (504050), FITC IgG (H&L) Monkey Adsorbed Conjugate (504011, 504071), Anti-Human IgA (α) AFF FITC (504023, 504045), a HU (Monkey Adsorbed) Conjugate (504015), 1% Evan's Blue (504049) et Mounting Medium (508001, 508005, 508006).

Procédure de test

Contrôle de qualité

Les contrôles positifs et négatifs doivent être utilisés à chaque fois que des échantillons sont testés.

1. **Diluer le concentré de PBS II.** Diluer le concentré de PBS II avec de l'eau distillée ou désionisée (1 volume de concentré de PBS II + 39 volumes d'eau distillée ou désionisée). Mélanger. Remarque : n'utiliser toute la quantité de PBS II fourni dans la trousse que si l'ensemble des éléments la composant doivent être utilisés dans le mois. Le PBS II sert à diluer les échantillons de patient et de tampon de lavage.
2. **Diluer les échantillons de patient.** Diluer les échantillons de patient au 10^6 en ajoutant 20 μ L de sérum dans 180 μ L de tampon PBS II.
3. **Lames de substrat.** laisser les lames de substrat revenir à température ambiante (18-28 °C) avant de les sortir de leurs sachets. Étiqueter les lames correctement, les placer dans une chambre humide, puis ajouter une goutte de contrôles positif et négatif dans les puits appropriés. Ajouter 50 μ L d'échantillon de patient dilué dans les puits restants.
4. **Incubation des lames.** Incuber les lames pendant 30 minutes dans une chambre humide à température ambiante (18-28 °C). Les serviettes en papier imbibées au fond de la chambre maintiennent l'humidité.
5. **Lavage au PBS II.** Sortir les lames de la chambre humide et les rincer brièvement avec la pissette de PBS II. Ne pas asperger directement les puits. Placer les lames sur un portoir et les immerger dans le PBS II. Agiter ou mélanger pendant 5 à 10 minutes.
6. **Ajout du conjugué marqué à la fluorescéine.** Secouer le tampon PBS II pour éliminer tout excès. Replacer les lames dans la chambre humide et recouvrir immédiatement chaque puits d'une goutte de conjugué marqué à la fluorescéine approprié. Le conjugué AFF FITC - IgG anti-humain (H&L) est destiné à détecter les auto-anticorps cutanés, tandis que le conjugué AFF FITC - IgA anti-humain (chaîne α) doit servir à détecter les auto-anticorps anti-endomysium. NE PAS LAISSER LES PUIITS DÉCOUVERTS PENDANT PLUS DE 15 SECONDES.
7. **Incubation des lames.** Incuber les lames pendant 30 minutes dans une chambre humide, à température ambiante (18-28 °C), dans l'obscurité.
8. **Lavage au PBS II.** Laver à nouveau comme à l'étape 5.
9. **Contre-colorant facultatif.** Ajouter 2 à 3 gouttes de Bleu d'Evans à 1 % pour 100 mL de PBS II avant l'immersion des lames.
10. **Préparation avec une lamelle.** Retirer une lame à la fois du lavage au PBS II. Sécher rapidement autour des puits et ajouter une goutte de préparation microscopique dans chaque puits. Abaisser lentement la lame sur la lamelle, en évitant la formation de bulles d'air. S'il y en a, ne pas tenter de les retirer. Essuyer l'excès de support du bord de la lamelle.
11. **Observer les lames au microscope à fluorescence.** Les lames peuvent être conservées jusqu'à 3 jours entre 2 et 8 °C, dans l'obscurité, sans perte significative de fluorescence.

Résultats

Contrôle de la qualité

Les contrôles positifs doivent développer une coloration vert pomme dans le ciment intercellulaire de l'épithélium (aspect « treillis métallique ») pour le pemphigus et dans les fibres ayant l'aspect de la réticuline dans les tissus conjonctifs entourant le muscle lisse pour le contrôle de l'endomysium. Le contrôle négatif doit produire une coloration vert sombre de tout le tissu, sans fluorescence discernable. Si les contrôles n'apparaissent pas comme décrit, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

Interprétation des résultats

Voir la cinquième référence bibliographique pour observer un exemple photographique en couleur de ce profil. Les résultats sont signalés positifs ou négatifs.

Anticorps anti-pemphigus positif

Coloration du ciment intercellulaire de l'épithélium stratifié.

Anticorps anti-pemphigoïde positif

Coloration de la membrane basale le long de la jonction dermo-épidermique.

Anticorps anti-endomysium positif⁴

Coloration des fibres ayant l'aspect de la réticuline dans les tissus conjonctifs entourant les fibres du muscle lisse.

Remarque : chaque laboratoire doit établir le seuil à partir duquel un résultat positif est considéré cliniquement significatif.

Limites du test

1. La source lumineuse, les filtres et le système optique de différents modèles de microscope à fluorescence influent sur la sensibilité du test. La performance du microscope est fortement influencée par le bon entretien, notamment le centrage de la lampe à vapeur de mercure et le remplacement de cette lampe après la durée recommandée.
2. L'œsophage de singe est un tissu auto-fluorescent, et ce quel que soit le procédé de production utilisé par le fabricant. Cette fluorescence est maximale dans la lamina propria et dans les régions sous-mucosales. Une attention toute particulière doit donc être portée à l'interprétation des échantillons présentant une faible coloration positive sur la muqueuse musculaire, à savoir au niveau de l'endomysium et du muscle lisse.
3. Les anticorps anti-nucléaires (ANA), anti-mitochondries (AMA), anti-muscle lisse (ASMA) et anti-muscle strié peuvent réagir avec le substrat d'œsophage. Leur présence doit être confirmée sur des substrats appropriés.
4. Des réactions croisées dues à la présence d'anticorps anti-groupe sanguin A et B peuvent être observées car la muqueuse de l'œsophage peut contenir des substances de certains groupes sanguins⁶. Chez certains patients, la coloration peut être identique à celle des anticorps anti-pemphigus, bien que les anticorps anti-groupe sanguin colorent aussi les capillaires du muscle de l'œsophage.
5. Les puits étant proches les uns des autres sur les lames de 10 puits, il est possible d'observer des contaminations croisées entre les échantillons et les contrôles. Veiller à les éviter, notamment pendant les étapes de lavage.
6. Seul, ce test ne doit pas être considéré comme diagnostique. Tous les autres facteurs, y compris les antécédents cliniques du patient et d'autres résultats de tests sérologiques ou de biopsie, doivent également être pris en compte.
7. L'adaptation des réactifs pour IFA d'autres fabricants n'a pas été évaluée, mais leur utilisation ne doit pas systématiquement être exclue.

Les lames vendues séparément sont classées dans la catégorie « Réactifs spécifiques à l'analyte ». Les caractéristiques analytiques et de performances ne sont pas établies, sauf comme élément de la trousse.

Valeurs attendues

Des lames d'œsophage de singe ont été utilisées pour tester le sérum de patients souffrant de la maladie de la peau pemphigus et de pemphigoïde, ainsi que de 20 donneurs de sang aléatoires. Les résultats sont les suivants :

Groupe de patients	Nombre	Nombre de positifs	
		Intracellulaire	Membrane basale
Pemphigus	12	12	0
Pemphigoïde	11	0	9
Sains	20	0	0

Anticorps IgA anti-endomysium

Sujets / Diagnostic	Positifs / Total	% positif
Maladie cœliaque confirmée		
Avec gluten	38/38	100
Avec régime sans gluten	17/37	46
Suspicion de maladie cœliaque		
Avec gluten	27/30	90
Avec régime sans gluten	5/30	17
Dermatite herpétiforme (total)	203/253	80
(Sous-total) atrophie des villosités confirmée	42/42	100
Donneurs de sang sains	0/87	0
Contrôles de la maladie (gastro-intestinale)		
Rectocolite ulcéro-hémorragique	0/59	0
Maladie de Crohn	0/41	0
Maladies du foie	0/20	0
Diarrhée infectieuse	0/210	0
Diarrhées infantiles	0/170	0
Diarrhée persistante	0/124	0
Sensibilité à la protéine de lait	0/60	0
Contrôles de la maladie (peau)		
Dermatite bulleuse à IgA linéaires	0/41	0
Maladies de peau autres que la dermatite herpétiforme	0/180	0

Données compilées à partir de plusieurs études, Chorzelski *et al* 1990⁷.

Performances spécifiques












Une étude comparative a été menée sur 43 échantillons de sérum (35 échantillons cliniques et 8 sains) en utilisant cette trousse et 2 méthodes de référence disponibles dans le commerce, l'une pour les échantillons de pemphigus et pemphigoïde positifs et l'autre, pour les échantillons d'endomysium positifs. Globalement, la concordance était bonne entre toutes les trousse. Pour le pemphigus, 10 des 13 échantillons étaient positifs avec les deux trousse. Deux des échantillons discordants étaient faiblement positifs avec la trousse et négatifs avec la trousse de référence. Pour le pemphigoïde, les 4 échantillons testés positifs ont concordé, bien que la coloration ait été légèrement plus faible avec la trousse du concurrent. Pour l'endomysium, les 18 échantillons testés ont été positifs avec les deux méthodes. Les 8 échantillons sains étaient négatifs avec les trois trousse.

Résumé du test

1. Diluer le PBS II avec de l'eau distillée ou déionisée.
2. Diluer les sérums de patient au 10^e avec le PBS II.
3. Laisser les lames de substrat s'équilibrer à température ambiante (18-28 °C).
4. Distribuer 50 µL de contrôles positifs et négatifs et de sérums de patients dilués dans les puits appropriés.
5. Laisser incubé pendant 30 minutes en chambre humide.
6. Laver pendant 5 à 10 minutes dans le PBS II.
7. Retirer l'excès de PBS et couvrir immédiatement chaque puits d'une goutte de conjugué.
8. Incuber comme à l'étape 5.
9. Laver comme à l'étape 6.
10. Monter.
11. Observer les lames au microscope à fluorescence.

NOVA Lite, Inova et Inova Diagnostics sont des marques d'Inova Diagnostics, Inc. © 2018 Inova Diagnostics, Inc. Tous droits réservés.

Symboles utilises

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Conformité aux normes européennes
	Représentant européen agréé
	Sur ordonnance uniquement, conformément aux dispositions de la FDA.
	Limite de température
	Code du lot
	Numéro de catalogue ou référence
	Fabricant
	Date de péremption
	Contenu suffisant pour
	Consulter les instructions d'utilisation.

Références

1. Sacchetti L, Ferrajolo A et al. (1996): Diagnostic value of various serum antibodies detected by diverse methods in childhood coeliac disease. *Clinical Chemistry* **42**: 11; 1838 – 1842.
2. Sategna-Guidetti C et al. (1995): Comparison of serum anti-gliadin, anti-endomysium and anti-jejunum antibodies, in adult celiac sprue. *J. Clin. Gastroenterol.* **20** (1) 17 – 21.
3. Weller, T H, Coons, A H. (1954): Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in vitro: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **86**: 789-794.
4. Hallstrom, O. (1989): Comparison of IgA class reticulin and endomysium antibodies in coeliac disease dermatitis herpetiformis *Gut.* **30**: 1225-1232.
5. Bradwell A R et al. (1999): *Advanced atlas of autoantibody patterns on tissues.* Pub: The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
6. Szulman A E. (1962): The histological distribution of blood group substances A and B in man. *J. Exp. Med.* **115**: 977
7. Chorzelski, T P et al. (1990): *Serologic Diagnosis of Celiac Disease.* CRC Press Boca Raton.
8. *Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004.* Ed. A Milford Ward, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

Fabricant:

Inova Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America
Technical Service (U.S. & Canada Only) : 1 877-829-4745
Technical Service (Outside the U.S.) : 1 858-805-7950
support@inovadx.com

Australian Sponsor:

Werfen Australia Pty Ltd
59-61 Dickson Avenue
Artarmon NSW 2064 Australia
Tel. +61 2 9098 0200 / 1300 369 132
<http://au.werfen.com/>

Représentant Autorisé:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

624145FR

Mai 2018
Révision 7

