

**FR**

ASA (œsophage de singe)

REF FA6001**IVD****Rx Only**

UTILISATION PRÉVUE

Le kit anticorps antipeau (ASA) est conçu pour la détection qualitative et semi-quantitative des anticorps associés au pemphigus et à la pemphigoïde bulleuse par la technique de l'immunofluorescence indirecte (IFA), et est destiné au diagnostic *In vitro*.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La plupart des autorités s'accordent à dire qu'il est conseillé d'étudier les anticorps sériques dans tous les cas de pemphigus vulgaire (PV) et de pemphigoïde bulleuse (PB) présumés (1 - 4). Des anticorps spécifiques sont mis en évidence dans pratiquement tous les cas actifs, en particulier si des tests répétés sont effectués à différents stades de la maladie (1). Le substrat le plus souvent recommandé pour ces études d'anticorps sériques est l'œsophage de singe (6). Les anticorps spécifiques du PV et du BP peuvent être détectés dans un seul test utilisant ce substrat. Les anticorps PV réagissent avec les substances intercellulaires entre l'épithélium pavimenteux de l'œsophage de singe, et les anticorps BP réagissent avec la membrane basale de la couche de cellules épithéliales pavimenteuses (1, 4 et 6). Une coloration des noyaux des cellules épithéliales malpighiennes par les anticorps antinucléaires peut se produire si le sérum provient de patients atteints de lupus systémique ou d'autres troubles du tissu conjonctif (7). Une coloration intercellulaire distincte peut être détectée dans les cas de pemphigus végétal, de pemphigus foliacé (y compris la forme brésilienne) et de pemphigus érythémateux (1). Bien qu'un seul test sérologique ne soit pas suffisant pour déterminer la posologie d'un traitement médicamenteux dans le cas du pemphigus végétatif, une diminution de deux fois le titre indique un contrôle efficace du processus pathologique. Bien qu'une certaine corrélation entre le titre et l'activité de la maladie soit observée dans la PB, la valeur pronostique est moindre que dans la PV en raison des fluctuations du titre. Les études sériques peuvent permettre de diagnostiquer la PV ou la PB ; cependant, il est souvent conseillé de réaliser des études immunohistochimiques directes sur des biopsies de lésions cutanées (1, 2). Les études immunofluorescentes directes des biopsies cutanées peuvent être facilitées par l'utilisation du fixateur de tissus et de la solution de lavage ZEUS, préparés selon Michel (5). Ce nouveau fixateur élimine la nécessité de congeler immédiatement l'échantillon de biopsie et permet de transporter des biopsies fraîches de peau et d'autres tissus jusqu'à 5 jours à température ambiante.

PRINCIPE DE L'ESSAI

L'ASA (œsophage de singe) est conçu pour détecter la présence d'anticorps circulants contre le pemphigus et la pemphigoïde bulleuse dans les sérums humains. Le test utilise un substrat de tissu d'œsophage de singe et de l'immunoglobuline de chèvre anti-humaine ajustée pour une dilution optimale et exempte de coloration de fond non spécifique. La réaction se déroule en deux étapes :

1. La première étape est l'interaction des anticorps anti-peau présents dans le sérum du patient avec l'œsophage de singe.
2. La deuxième étape est l'interaction de l'immunoglobuline anti-humaine marquée au FITC avec les anticorps attachés au ciment intercellulaire des cellules épithéliales dans le cas du pemphigus, ou à la zone de la membrane basale dans le cas de la pemphigoïde bulleuse dans un test positif (voir la section Procédure de test pour plus de détails).

L'ASA (œsophage de singe) permet de détecter les anticorps PV et BP. Ce test est une aide de laboratoire particulièrement utile pour le diagnostic de la PV et de la PB, car la majorité des patients non traités atteints d'une maladie active contiennent des anticorps anti-peau dans leur sérum.

RÉACTIFS

Matériaux fournis :

Chaque kit contient les composants suivants en quantités suffisantes pour effectuer le nombre de tests indiqué sur l'étiquette de l'emballage. **REMARQUE : Le conjugué et les contrôles contiennent une combinaison de procline (0,05 % v/v) et d'azoture de sodium (<0,1 % w/v) comme conservateurs.**

SLD	1	Œsophage de singe Lames de substrat : Dix lames de 8 puits avec buvard absorbant et sachet déshydratant.
CONJ	2	Conjugué : Anticorps anti-IgG humaine de chèvre marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Contient du tampon phosphate avec de la BSA et du contre-colorant. Deux flacons de 3,5 ml à bouchon ambré. Prêt à l'emploi.
CTRL + 1	3	Contrôle positif PV (sérum humain) : Produit une coloration des cellules épithéliales squameuses du substrat. Un flacon de 0,5 ml à bouchon rouge. Prêt à l'emploi.
CTRL + 2	4	Contrôle positif BP (sérum humain) : Produit une coloration de la membrane basale du substrat. Un flacon de 0,5 ml, à bouchon bleu. Prêt à l'emploi.
CTRL -	5	Contrôle négatif (sérum humain) : Ne produit pas de coloration du substrat. Un flacon de 0,5 ml à bouchon vert. Prêt à l'emploi.
BUF PBS		Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) : pH 7,2 ± 0,2. Vider le contenu de chaque sachet de tampon dans un litre d'eau distillée ou désionisée. Mélanger jusqu'à ce que tous les sels soient bien dissous. Deux sachets, suffisants pour préparer 2 litres.
MNTMED		Milieu de montage (glycérol tamponné) : Un flacon de 3,0 ml, à bouchon blanc et à embout goutte-à-goutte.
COVGLS		Verre de protection. Paquet de douze, 24 x 60 mm, épaisseur 1.

REMARQUES :

1. Les composants suivants ne dépendent pas du numéro de lot du kit et peuvent être utilisés de manière interchangeable avec les systèmes de test IFA Sebia, tant que les numéros de produit sont identiques : Milieu de montage (N° de produit : FA0009S) PBS (N° de produit : 0008S), et verre de protection (N° de produit : S8007)

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

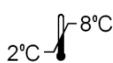
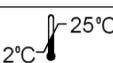
1. Microscope automatisé dIFine® ou microscope à fluorescence correctement équipé.
2. Petites pipettes sérologiques, pasteur, capillaires ou automatiques.
3. Embouts de pipette à usage unique.
4. Petits tubes à essai, 13 x 100 mm ou comparables.
5. Supports pour tubes à essai.
6. Coupelle de coloration : Une grande coupelle de coloration avec un petit dispositif de mélange magnétique constitue un mécanisme idéal pour le lavage des lames entre les étapes d'incubation.
7. Eau distillée ou désionisée.
8. Microscope à fluorescence correctement équipé.
9. Cylindre gradué de 1 litre.
10. Minuterie de laboratoire pour contrôler les étapes de l'incubation.
11. Bassin d'élimination, gants jetables et désinfectant (par exemple : 10 % d'eau de Javel - 0,5 % d'hypochlorite de sodium).

Les systèmes de filtrage suivants, ou leur équivalent, ont été jugés satisfaisants pour une utilisation de routine avec des montages de fond noir en lumière transmise ou incidente :

Lumière transmise		
Source de lumière : Vapeur de mercure 200W ou 50W		
Filtre d'excitation	Filtre d'excitation	Filtre d'excitation
KP490	KP490	KP490
BG12	BG12	BG12
FITC	FITC	FITC
Source de lumière : Tungstène - Halogène 100W		
KP490	KP490	KP490

Lumière incidente			
Source de lumière : Vapeur de mercure 200, 100, 50 W			
Filtre d'excitation	Filtre d'excitation	Filtre d'excitation	Filtre d'excitation
KP500	KP500	KP500	KP500
FITC	FITC	FITC	FITC
Source de lumière : Tungstène - Halogène 50 et 100 W			
KP500	KP500	KP500	KP500
FITC	FITC	FITC	FITC

CONDITIONS DE STOCKAGE

	Kit non ouvert.
	Milieu de montage, conjugué, lames, contrôles positifs et négatifs.
	PBS réhydraté (stable pendant 30 jours).
	Sachets de phosphate salé tamponné (PBS).

PRÉCAUTIONS

1. Pour le diagnostic *In Vitro*.
2. Respecter les précautions habituelles lors de la manipulation des réactifs de laboratoire. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment à l'eau et consulter un médecin. Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage. Ne pas respirer les vapeurs. Éliminer les déchets en respectant les lois locales, régionales et fédérales.
3. Les puits de la lame ne contiennent pas d'organismes viables. Cependant, considérez la lame **comme du matériel potentiellement bio-dangereux** et manipulez-la en conséquence.
4. Les contrôles sont des **matières potentiellement bio-dangereuses**. Les matières premières à partir desquelles ces produits ont été dérivés se sont révélées négatives pour l'antigène VIH-1, l'HBsAg et pour les anticorps contre le VHC et le VIH par des méthodes d'essai approuvées. Toutefois, étant donné qu'aucune méthode de test ne peut garantir l'absence totale d'agents infectieux, ces produits doivent être manipulés au niveau de biosécurité 2 recommandé pour tout sérum humain ou échantillon de sang potentiellement infectieux dans le manuel des Centres de contrôle des maladies/Instituts nationaux de la santé intitulé « Biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux » : édition actuelle ; et dans la norme de l'OSHA relative aux agents pathogènes transmissibles par le sang (20).
5. Le respect de la durée et de la température d'incubation spécifiées est essentiel pour obtenir des résultats précis. **Tous les réactifs doivent atteindre la température ambiante (20 - 25°C) avant de commencer l'essai.** Remettre immédiatement les réactifs non utilisés dans leur emballage d'origine et respecter les conditions de stockage.
6. Un lavage incorrect peut entraîner des résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Veiller à réduire au minimum la quantité de PBS résiduel, en utilisant un buvard, avant d'ajouter le conjugué. Ne pas laisser les puits se dessécher entre les incubations.
7. Le conjugué et les contrôles contiennent de l'azoture de sodium à une concentration <0,1 % (w/v). On a signalé que l'azoture de sodium forme des azides de plomb ou de cuivre dans la plomberie des laboratoires, ce qui peut provoquer des explosions lors du martelage. Pour éviter cela, rincer abondamment l'évier à l'eau après avoir éliminé la solution contenant de l'azoture de sodium. Ce conservateur peut être toxique en cas d'ingestion.
8. La dilution ou l'altération de ces réactifs peut entraîner des résultats erronés.
9. Ne jamais pipeter par la bouche. Éviter tout contact des réactifs et des échantillons de patients avec la peau et les muqueuses.
10. Éviter la contamination microbienne des réactifs. Des résultats erronés peuvent survenir.
11. La contamination croisée des réactifs et/ou des échantillons peut entraîner des résultats erronés.
12. La verrerie réutilisable doit être lavée et rincée à fond sans aucun détergent.
13. Éviter les éclaboussures et la formation d'aérosols.
14. Ne pas exposer les réactifs à une forte lumière pendant le stockage ou l'incubation.

15. Laisser le paquet de lames s'équilibrer à la température ambiante avant d'ouvrir l'enveloppe protectrice afin de protéger les puits et le buvard de la condensation.
16. Recueillir la solution de lavage dans une cuvette d'élimination. Traiter la solution de déchets avec un désinfectant (par exemple : 10 % d'eau de Javel - 0,5 % d'hypochlorite de sodium). Éviter d'exposer les réactifs aux vapeurs d'eau de Javel.
17. Ne pas exposer les réactifs à des solutions contenant de l'eau de Javel ou à des odeurs fortes provenant de solutions contenant de l'eau de Javel. Des traces d'eau de Javel (hypochlorite de sodium) peuvent détruire l'activité biologique de nombreux réactifs contenus dans ce kit.
18. Ne pas exercer de pression sur l'enveloppe de la lame. Cela pourrait endommager le substrat.
19. Les composants de ce kit sont adaptés pour une sensibilité et une reproductibilité optimales. Les réactifs d'autres fabricants ne doivent pas être interchangeables. Suivre attentivement la notice d'utilisation.
20. Les composants non ouverts/ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, à condition que les conditions de stockage recommandées soient strictement respectées. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption. Ne pas congeler.
21. Le colorant bleu Evans est potentiellement cancérigène. En cas de contact avec la peau, rincer à l'eau. Éliminer conformément aux réglementations locales.
22. Ne pas laisser sécher les lames pendant la procédure. Selon les conditions du laboratoire, il peut être nécessaire de placer les lames dans une chambre humide pendant les incubations.

PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

1. Effectuer le prélèvement échantillons conformément au document M29 du CLSI : Protection des travailleurs de laboratoire contre les maladies infectieuses acquises en milieu professionnel. Aucune méthode de test connue ne peut garantir que les échantillons de sang humain ne transmettront pas d'infection. Par conséquent, tous les dérivés sanguins doivent être considérés comme potentiellement infectieux.
2. Seuls les sérums fraîchement prélevés et correctement réfrigérés obtenus par des procédures de ponction veineuse aseptiques approuvées avec ce test (8). Aucun anticoagulant ou conservateur ne doit être ajouté. Éviter d'utiliser des sérums hémolysés, lipémiques ou contaminés par des bactéries.
3. Conserver l'échantillon à température ambiante pendant 8 heures au maximum. Si le test n'est pas effectué dans les 8 heures, les sérums peuvent être conservés à une température comprise entre 2 et 8° C pendant 48 heures au maximum. Si le test est retardé, conserver les sérums à tester à -20°C ou moins. Éviter les cycles multiples de congélation/décongélation qui peuvent entraîner une perte d'activité de l'anticorps et donner des résultats erronés. Il incombe à chaque laboratoire d'utiliser toutes les références disponibles et/ou ses propres études pour déterminer les critères de stabilité pour son laboratoire (11).

PROCÉDURE DE TEST

1. Sortir les lames du réfrigérateur et les laisser se réchauffer à température ambiante (20 - 25°C). Déchirer l'enveloppe protectrice et retirer les lames. **Ne pas appliquer de pression sur les côtés plats de l'enveloppe protectrice.**
2. Identifier chaque puits avec les sérums de patients et les contrôles appropriés. **REMARQUE : Les contrôles sont destinés à être utilisés non dilués.** Préparer une dilution de 1:10 (par exemple : 10µL de sérum + 90µL de PBS) du sérum de chaque patient.

Options de dilution :

- a. Les utilisateurs peuvent titrer le contrôle positif jusqu'au point de terminaison pour servir de contrôle semi-quantitatif (1+ réactivité minimale). Dans ce cas, le contrôle doit être dilué deux fois dans du PBS. Une dilution finale est établie et imprimée sur le flacon de contrôle positif (\pm une dilution). Il convient de noter qu'en raison des variations au sein du laboratoire (équipement, etc.), chaque laboratoire doit établir son propre titre attendu au point de terminaison pour chaque lot de contrôle positif.
 - b. Lors du titrage d'échantillons de patients, la dilution initiale et toutes les dilutions suivantes doivent être préparées dans du PBS uniquement.
3. Laver les lames pendant 3 à 5 minutes dans du PBS.
 4. Retirer les lames du PBS et les sécher avec du papier buvard à six puits. Il est conseillé de placer le papier buvard sur une surface plane. Placer ensuite la lame de substrat en position inversée au-dessus du buvard. Appuyer fermement sur le dos de la lame. Ne pas laisser sécher le support tissulaire pendant toute la durée de la procédure d'essai.
 5. À l'aide d'un distributeur approprié (listé ci-dessus), distribuer 20µL de chaque contrôle et de chaque sérum de patient dilué dans les puits appropriés.
 6. Incuber les lames à température ambiante (20 - 25°C) pendant 35±5 minutes.
 7. Rincer doucement les lames avec du PBS. **Ne pas diriger un flux de PBS dans les puits de test.**
 8. Laver les lames pendant deux intervalles de 5 minutes, en changeant de PBS entre les lavages.
 9. Retirer les lames du PBS une par une. Inverser la lame et caler les puits sur les trous des buvards fournis. Éponger la lame en essuyant le verso à l'aide d'une lingette absorbante. **ATTENTION : Placer le buvard et la lame sur une surface dure et plane. Le buvard sur du papier absorbant peut détruire la matrice de la lame. Ne pas laisser les lames sécher pendant la procédure de test.**
 10. Ajouter 20-40µL de conjugué dans chaque puits.
 11. Répéter les étapes 6 à 9.

- Appliquer 3 à 5 gouttes de milieu de montage sur chaque lame entre les puits et poser le verre de protection. Il est également possible d'appliquer une petite quantité de milieu de montage dans chaque puits et d'appliquer un verre de protection. Examiner immédiatement les lames à l'aide d'un microscope à fluorescence approprié.

REMARQUE : Si l'examen des lames est retardé, sceller la lamelle couvre-objet avec du vernis à ongles transparent et la conserver au réfrigérateur. Il est recommandé d'examiner les lames le jour même du test.

CONTRÔLE QUALITÉ

- Chaque fois que le test est effectué, un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus.
- Il est recommandé de lire les contrôles positif et négatif avant d'évaluer les résultats du test. Cela permet d'établir les références nécessaires à l'interprétation de l'échantillon testé. Si les contrôles ne sont pas conformes à la description, les résultats ne sont pas valables.
 - Contrôle négatif - caractérisé par l'absence de coloration fluorescente des cellules épithéliales malpighiennes et/ou de la zone de la membrane basale.
 - Contrôles positifs - PV Le contrôle positif est caractérisé par une coloration fluorescente vert pomme entre les cellules épithéliales squameuses. Le contrôle positif BP se caractérise par une coloration spécifique de la zone de la membrane basale.
- Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux lignes directrices ou aux exigences des réglementations locales, nationales et/ou fédérales ou des organismes d'accréditation.

REMARQUES :

- L'intensité de la fluorescence observée peut varier en fonction du microscope et du système de filtrage utilisés.**
- Il peut y avoir un piégeage non spécifique des réactifs. Il est important de laver correctement les lames pour éliminer les résultats faussement positifs.**

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- Toute coloration vert pomme des structures spécifiques mentionnées ci-dessus sur une échelle de 1+ à 4+ est considérée comme positive. Un 1+ est considéré comme une réaction faible, et un 4+ comme une réaction forte. Tous les sérums positifs à une dilution de 1:10 doivent être titrés jusqu'à la dilution finale. Pour ce faire, on effectue des dilutions en série au 1:20, au 1:40, au 1:80, etc. de tous les positifs. Le point final est la dilution la plus élevée qui produit une réaction positive perceptible. La coloration spécifique des noyaux des cellules épithéliales est considérée comme un test positif pour les anticorps antinucléaires qui peuvent être associés au LED et à d'autres maladies du tissu conjonctif.
- Les titres inférieurs à 1:10 sont considérés comme négatifs.
- Test positif :
 - Une coloration intercellulaire spécifique entre les cellules épithéliales squameuses est considérée comme un test positif pour les anticorps du pemphigus.
 - La coloration spécifique de la zone de la membrane basale est considérée comme un test positif pour la pemphigoïde bulleuse.

LIMITES DE L'ESSAI

- L'ASA (œsophage de singe) est un outil de laboratoire qui ne permet pas de poser un diagnostic.
- Les résultats doivent être interprétés à la lumière de l'état clinique du patient.
- Ce produit ne vise pas à établir un lien définitif entre le motif de fluorescence et un état pathologique spécifique.
- Il n'existe pas de norme américaine en matière d'activité.

RÉFÉRENCES

- Étude coopérative. Utilisations pour le test d'immunofluorescence de la peau et des sérums. Utilisation de l'immunofluorescence dans le diagnostic des maladies bulleuses, du lupus érythémateux et de certaines autres dermatoses. Arch. Dermatol. 111:372-381, 1975.
- Jablonski S, Chorzelski TP, Beutner EH, *et al*: Indications pour les études d'immunofluorescence cutanée et sérique en dermatologie. En : Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, *et al* (Eds) : Immunopathologie de la peau. Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson et Ross, pp. 1-24, 1973.
- Chorzelski TP, Jablonski S, Beutner EH : Signification clinique des anticorps du pemphigus dans : Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, *et al* (Eds) : Immunopathologie de la peau, Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson, and Ross. pp. 25-43, 1973.
- Levier WF : Pemphigus et pemphigoïde. Springfield, IL, Charles C. Thomas, éditeur. pp. 3-226, 1965.
- Michel B, Milner Y, David K : Préservation des immunoglobulines fixées sur tissu dans les biopsies cutanées de patients atteints de lupus érythémateux et de maladies bulleuses : Rapport préliminaire. J. Invest. Dermatologie 59 : 449-454, 1973.
- Anderson P, Hale WL : Immunohistologie des anticorps humains sur l'œsophage du singe, In : Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, *et al* (Eds) : Immunopathologie de la peau. Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson et Ross : pp. 271-286, 1973.
- Tan EM, Vaughn JH : anticorps antinucléaires : Importance des spécificités biochimiques, In Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, *et al* (Eds) : Immunopathologie de la peau. Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson et Ross : pp. 367-378, 1973.
- Procédures de prélèvement d'échantillons sanguins diagnostiques par ponction veineuse - Deuxième édition : norme approuvée (1984). Publié par le Comité national pour les normes de laboratoire clinique.

9. Lennette DA : Collecte et préparation des échantillons pour l'examen virologique. En : Manuel de microbiologie clinique, 4e édition, EH Lennette, A Balows, WJ Hausler et HJ Shadomy (Eds) : Société américaine de microbiologie, Washington, DC. Ch. 61, pp. 687-693, 1985.
10. Département du travail des États-Unis, administration de la sécurité et de la santé au travail : Exposition professionnelle aux agents pathogènes transmissibles par le sang, règle finale. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
11. Procédures pour la manipulation et le traitement des échantillons de sang pour les tests de laboratoire courants ; lignes directrices approuvées - 4e édition (2010). Document GP44-A4 du CLSI (ISBN 1-56238-724-3). Institut des normes cliniques et de laboratoire, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.

GLOSSAIRE DES SYMBOLES

Les symboles suivants **peuvent** avoir été utilisés dans l'étiquetage de ce produit.

Symbole	Description	Symbole	Description
	Fabricant	SLD	Lame de substrat
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro.	BUF PBS	Tampon PBS
REF	Numéro de catalogue	MNTMED	Milieu de montage
	Suffisant pour n tests	CONJ	Conjugué
LOT	Code du lot	CTRL + 1	Contrôle positif PV
	Utilisation par	CTRL -	Contrôle négatif
	Limites de la température de stockage	CTRL + 2	Contrôle positif BP
RX Only	Uniquement sur ordonnance	Fabriqué aux États-Unis	Fabriqué aux États-Unis
	Consulter le mode d'emploi électronique	↑↑	Stocker en position verticale
	Tenir à l'écart de la lumière du soleil	COVGLS	Verre de protection
CE	Conformité avec la directive 98/79		



ZEUS Scientific

200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
 Numéro gratuit (États-Unis) : 1-800-286-2111, option 2
 International : +1 908-526-3744
 Fax : +1 908-526-2058
 Site internet : www.zeusscientific.com

Pour le service client américain, contactez votre distributeur local.

Pour l'assistance technique aux États-Unis, contactez ZEUS Scientific, appelez le numéro gratuit ou envoyez un mail

À l'adresse support@zeusscientific.com.

Pour le service client et l'assistance technique en dehors des États-Unis, veuillez contacter votre distributeur local.

©2019 ZEUS Scientific. Tous droits réservés.



EMERGO EUROPE
 Westervoortsedijk 60
 6827 AT Arnhem
 The Netherlands