AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

MANUEL D'INSTRUCTIONS

AESKUSLIDES® ANCA

Ref 54.xxx

CE

AESKUSLIDES®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



eIFU
WWW.AESKU.COM

MANUEL D'INSTRUCTIONS

ANCA

Réf.	Description	Tests
54.100	**ANCA Ethanol** (12 puits)	120
54.101	**ANCA Formalin** (12 puits)	120
54.050	**ANCA Ethanol** (6 puits)	60
54.051	**ANCA Formalin** (6 puits)	60

Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim
Germany
Phone: +49 6734 9622-0
Fax: +49 6734 9622-2222
Website: www.aesku.com
Mail: info@aesku.com

Table des matières

1. UTILISATION PREVUE 1
2. APPLICATION CLINIQUE 1
3. PROCEDURE DE TEST AVEC LE KIT 3
4. INTERPRETATION 3
5. CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DE RENDEMENT 3
5.1 Sensibilité/spécificité 3
5.2 Reproductibilité et précision 4
6. FICHE D'INTERPRÉTATION DES DONNÉES 5
7. CONTENU DES KIT STANDARD 6
8. RÉACTIFS COMMUNS 7
a. Réactifs communs 7
b. Matériel nécessaire mais non fourni 7
9. STOCKAGE ET DURÉE DE CONSERVATION 8
10. PRÉCAUTIONS D'EMPLOI 8
c. Données relatives aux risques pour la santé 8
d. Règles générales pour l'utilisation 9
11. RECUEIL D'ÉCHANTILLONS, MANIPULATION ET STOCKAGE 9
12. PROCÉDURE DU TEST 10
e. Préparation 10
f. Réalisation du test 11
g. Procédure 12
13. DÉPANNAGE 13
14. SYMBOLES RÉGLEMENTAIRES 14

ANCA

1. UTILISATION PREVUE

***AESKUSLIDES*® ANCA** est une méthode d'immunofluorescence indirecte pour la recherche des anticorps anticytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) dans le sérum humain.

L'essai est un outil de diagnostic différentiel des vascularités associées aux ANCA (AAV) telles que la granulomatose de Wegener[1] avec polyangéite, la polyangéite microscopique et le syndrome de Churg-Strauss.

2. APPLICATION CLINIQUE

L'acronyme ANCA (Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies) désigne un groupe d'anticorps dirigés contre différents constituants des granulocytes et monocytes neutrophiles. Pour mettre en évidence des ANCA, le test d'immunofluorescence indirecte effectué sur les neutrophiles fixés par l'éthanol est une méthode qui a jusqu'ici fait ses preuves. Il a révélé que certains ANCA créent une fluorescence cytoplasmique (appelés c-ANCA) tandis que d'autres créent une fluorescence périnucléaire (p-ANCA) sur les neutrophiles fixés par l'éthanol. Etant donné que les deux aspects de fluorescence peuvent recouvrir plusieurs antigènes, l'immunofluorescence ne suffit pas pour établir un diagnostic différentiel satisfaisant de la vascularité. C'est pourquoi chaque test d'immunofluorescence (IFT) doit être vérifié par les tests ELISA spécifiques[2,3].

Certains ANCA produisent un aspect de fluorescence atypique (A-ANCA) qui peut s'avérer techniquement difficile à distinguer de l'aspect généré par les anticorps antinucléaires (ANA) sur les neutrophiles fixés par l'éthanol. Afin de faciliter leur différenciation, des neutrophiles préalablement fixés au formaldéhyde sont utilisés. Les ANCA donnant lieu à une coloration cytoplasmique et atypique (p-ANCA/A-ANCA) dans les neutrophiles fixés par l'éthanol font apparaître une coloration cytoplasmique lorsque des neutrophiles fixés par formaldéhyde servent de substrat. Si la coloration n'apparaît pas, il faut procéder au test des ANA avec des cellules HEp-2.[4]

La myéloperoxidase (MPO) a été identifiée comme étant l'antigène principal reconnu par la majorité des p-ANCA (anti-MPO-ANCA). Cependant, d'autres constituants cellulaires tels que la lactoferrine, la cathepsine G, le lysozyme et l'élastase entraînent aussi une coloration périnucléaire et sont ainsi inclus dans le groupe des p-ANCA. Pourtant, ils ne sont pas spécifiquement associés aux AAV et peuvent jouer un rôle dans le diagnostic différentiel de pathologies autres que les vascularités.[5]

En revanche, la protéinase 3 est l'antigène cible principal reconnu par les c-ANCA (anti-PR3-

[1] Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman GS, Jayne DR, Jennette JC et al. Granulomatosis with Polyangiitis (Wegener's): An alternative name for Wegener's Granulomatosis. Arthritis Rheum 2011; 63: 863-864.
[2] Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). Am J Clin Pathol 1999; 111: 507-513.
[3] Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC et al. Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. Am J Clin Pathol 2003; 120: 312-318.
[4] Csernok E, Holle JU. Twenty-eight years with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): how to test for ANCA – evidence-based immunology? Autoimmun Highlights 2010; 1: 39-43.
[5] Wiik A, Stummann L, Kjeldsen L, Borregaard N, Ullman S, Jacobsen S et al. The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens. Clin Exp Immunol 1995; 101 Suppl 1: 15-17.

ANCA).[6] Un autre antigène, la protéine BPI (bactéricide/perméabilité- croissante), peut conduire à la production d'un c-ANCA.[7]

Les ANCA sont souvent présents chez les patients souffrant de polyangéite microscopique (60 % d'anti-MPO-ANCA, 30 % d'anti-PR3-ANCA) et ceux atteints du syndrome de Churg-Strauss (30 % d'anti-MPO-ANCA, 30 % d'anti-PR3-ANCA).[8] Les auto-anticorps anti-PR-3 sont des marqueurs sérologiques spécifiques de la granulomatose (de Wegener) avec polyangéite. Ici, entre 50 % (maladie localisée) et 95 % (maladie généralisée) d'anti-PR3-ANCA apparaissent.[9]

Les anticorps dirigés contre les autres antigènes correspondants aux ANCA tels que la lactoferrine, la cathepsine G, l'élastase et la protéine BPI ont été associés à de nombreuses maladies. Cependant, l'intérêt clinique explicite de cette association continue d'être étudié.[5] Dans le cas des anticorps anti-élastase, la corrélation avec les lésions destructrices de la ligne médiane induites par cocaïne (CIMDL) a été démontrée.[10]

Caractérisation de l'antigène : neutrophiles humains (granulocytes) fixés soit par l'éthanol, soit au formaldéhyde

Réactivité croisée : la présence d'ANA, telle que décrite à la section Application clinique, fait apparaître une fluorescence pouvant être confondue avec des p-ANCA/a-ANCA. Aucune autre réactivité croisée n'existe.

La mise en évidence des anticorps s'appuie sur le principe du test d'immunofluorescence (IFA). Des lames porte-objet pour microscope sont recouvertes de sections de tissu ou de cellules (cellules HEp-2 (ANA), granulocytes (ANCA) ou *Crithidia luciliae* (ADNn)). Si le sérum du patient contient des anticorps spécifiques, ceux-ci vont se lier pendant la première étape d'incubation. Après plusieurs étapes de rinçage de la matière non liée, les anticorps liés sont mis en évidence au moyen d'un conjugué d'anti-immunoglobuline humaine marqué à la fluorescéine durant la deuxième étape d'incubation. Une fluorescence verte, spécifique du complexe antigène-anticorps, est observée au microscope à fluorescence.

[6] Gross WL, Csernok E, Helmchen U. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigens, and systemic vasculitis. APMIS 1995; 103: 81-97.

[7] Zhao MH, Jones SJ, Lockwood CM. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. Clin Exp Immunol 1995; 99: 49-56.

[8] Bosch X, Guilabert A, Font J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. Lancet 2006; 368: 404-418.

[9] Holle JU, Csernok E, Gross WL. Wegener Granulomatosis. 2008; In: Diagnostic Criteria in autoimmune Diseases, Shoenfeld Y, Cervera R, and Gershwin ME, eds. Humana Press, pp. 99-102.

[10] Wiesner O, Russell KA, Lee AS, Jenne DE, Trimarchi M, Gregorini G et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with human neutrophil elastase as a diagnostic marker for cocaine-induced midline destructive lesions but not autoimmune vasculitis. Arthritis Rheum 2004; 50: 2954-2965.

3. PROCEDURE DE TEST AVEC LE KIT

Consulter la Procédure de test du Instructions commun, section 11, pour des instructions détaillées. Les informations suivantes doivent être respectées avec les kits ANCA :

- Temps de contre-coloration : 30-90 secondes
- Titre de dépistage recommandé: 1:20

4. INTERPRETATION

Les anticorps anticytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) revêtent une importance clinique majeure dans l'évaluation des troubles vasculaires chez le patient.

Le titre final adapté est celui pour lequel le sérum du patient montre une simple fluorescence positive. Une fluorescence faible, avec des titres compris entre 1:20 et 1:80, ou une imprécision des résultats cliniques doivent être vérifiées par un contrôle de surveillance. En pareil cas, les échantillons doivent être recueillis environ toutes les 3 semaines et testés de manière similaire.

1:20	25 µL sérum	+	475 µL tampon d'échantillon
1:40	20 µL sérum	+	780 µL tampon d'échantillon (respectivement 1:2 de la dilution « 1:20 »)
1:80	10 µL sérum	+	790 µL tampon d'échantillon (respectivement 1:2 de la dilution « 1:40 »)
1:160	10 µL sérum	+	1590 µL tampon d'échantillon (respectivement 1:2 de la « 1:80 »)

etc.

L'aspect classique des c-ANCA est une coloration homogène granulaire cytoplasmique avec une coloration minimale de la zone nucléaire.

Les p-ANCA montrent une coloration périnucléaire clairement délimitée (neutrophiles fixés par l'éthanol) ou les c-ANCA une coloration cytoplasmique (neutrophiles fixés au formaldéhyde).

5. CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DE RENDEMENT

5.1 Sensibilité/spécificité

Les tests ***AESKUSLIDES*®** **ANCA Ethanol** et **ANCA Formalin** ont été comparés à d'autres systèmes de test d'immunofluorescence indirecte disponibles dans le commerce utilisant des neutrophiles fixés à l'éthanol et à la formaline. Le sérum de 132 patients atteints de vascularite associée aux ANCA et le sérum de 375 patients atteints d'autres maladies (témoins non sains) ont été analysés manuellement et évalués à l'aide de deux lecteurs. Une dilution seuil de 1:20 a été utilisée pour déterminer la positivité des échantillons. Les échantillons cliniques représentaient un spectre complet de maladies auto-immunes.

La comparaison avec l'ANCA Ethanol a produit les résultats suivants :

		Prédicat		
		Positif	Négatif	Total
AESKUSLIDES® ANCA Ethanol	Positif	145	34	179
	Négatif	71	257	328
	Total	216	291	507

Sensibilité = 145/216 = 67,1 % (IC de 95 % : 60,6 - 73,0 %)
Spécificité = 257/291 = 88,3 % (IC de 95 % : 84,1 - 91,5 %)

La comparaison avec l'ANCA Formalin a produit les résultats suivants :

		Prédicat		
		Positif	Négatif	Total
AESKUSLIDES® ANCA Formalin	Positif	66	35	101
	Négatif	16	390	406
	Total	82	425	507

Sensibilité = 66/82 = 80,5 % (IC de 95 % : 70,6 - 87,6 %)
Spécificité = 390/425 = 91,8 % (IC de 95 % : 88,8 - 94,0 %)

Les intervalles de confiance à 95 % correspondent à ceux de la méthode des scores de Wilson[11].

5.2 Reproductibilité et précision

Des études intra-laboratoires, inter-laboratoires et inter-lots ont été réalisées pour démontrer la reproductibilité **d'*AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** et **d'ANCA Formalin**. Huit échantillons de sérum ont été analysés à l'aide **d'*AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol**. Pour ***AESKUSLIDES*® ANCA Formalin**, dix échantillons ont été utilisés. Tous les échantillons – comprenant des échantillons négatifs et des échantillons faiblement, moyennement et fortement positifs correspondant à deux profils différents (P-ANCA et C-ANCA) – ont été traités manuellement et à l'aide du **HELIOS® Automated IFA System**, puis évalués à l'aide de deux lecteurs. Pour les études intra-laboratoire et inter-laboratoires, les échantillons ont été testés pendant cinq jours, à raison de deux analyses par jour et de trois répétitions par analyse sur trois sites d'étude. Pour démontrer la variabilité entre les lots, les échantillons **d'*AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** et **ANCA Formalin** ont été testés à dix reprises avec trois lots de kits distincts. Le pourcentage de concordance entre les réponses positives et négatives était ≥ 90 %. Le profil et l'intensité de la fluorescence des échantillons ont été constants sur tous les puits testés.

[11] Wilson, E. B. (1927). Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. Journal of the American Statistical Association, 22(158), 209–212. https://doi.org/10.2307/2276774

6. FICHE D'INTERPRÉTATION DES DONNÉES

ANCA

Date:	LOT:	Fixation
Lame nº:	Opérateur:	ethanol: ☐ formalin: ☐

N° de puits	ID	Facteur de dilution	I.F.	nucléoplasme	cytoplasme	Auto-anticorps	Remarques
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							

7. CONTENU DES KIT STANDARD

		LAMES				CONJUGUE			CONTROLE POSITIF		
Réf. kit	**Description du kit**	**Réf.**	**Puits**	**Recouvert de**	**Quantité**	**Réf.**	**Description**	**Quantité**	**Réf. kit**	**Description du kit**	**Quantité**
54.100	**ANCA Ethanol (12 puits)**	**S54.100**	12	neutrophiles humains (fixation par éthanol)	10	**C54.100**	**IgG** Bouchon bleu : solution légèrement bleue. Contenu : ASB, Tween, fluorescéine (FITC) étiqueté anticorps anti-humain	1 x 4,8 ml	**PC54.100**	ANCA contrôle aspect C-ANCA Bouchon rouge : solution incolore.Conenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium <0,1 % (conservateur)	1 x 0,5 ml
									PC54.101	ANCA contrôle aspect P-ANCA Bouchon rouge : solution incolore.Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium <0,1 % (conservateur)	
54.101	**ANCA Formalin (12 puits)**	**S54.101**	12	neutrophiles humains (fixation au formaldéhyde)	10	**C54.101**	**IgG** Bouchon bleu : solution légèrement bleue. Contenu : ASB, Tween, fluorescéine (FITC) étiqueté anticorps anti-humain	1 x 4,8 ml	**PC54.100**	ANCA contrôle aspect C-ANCA Bouchon rouge : solution incolore.Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium <0,1 % (conservateur)	1 x 0,5 ml
									PC54.101	ANCA contrôle aspect P-ANCA Bouchon rouge : solution incolore.Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium <0,1 % (conservateur)	
54.050	**ANCA Ethanol (6 puits)**	**S54.050**	6	neutrophiles humains (fixation par éthanol)	10	**C54.050**	**IgG** Bouchon bleu : solution légèrement bleue. Contenu : ASB, Tween, fluorescéine (FITC) étiqueté anticorps anti-humain	1 x 2,4 ml	**PC54.100**	ANCA contrôle aspect C-ANCA Bouchon rouge : solution incolore.Conenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium <0,1 % (conservateur)	1 x 0,5 ml
									PC54.101	ANCA contrôle aspect P-ANCA Bouchon rouge : solution incolore.Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium <0,1 % (conservateur)	
54.051	**ANCA Formalin (6 puits)**	**S54.051**	6	neutrophiles humains (fixation au formaldéhyde)	10	**C54.051**	**IgG** Bouchon bleu : solution légèrement bleue. Contenu : ASB, Tween, fluorescéine (FITC) étiqueté anticorps anti-humain	1 x 2,4 ml	**PC54.100**	ANCA contrôle aspect C-ANCA Bouchon rouge : solution incolore.Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium <0,1 % (conservateur)	1 x 0,5 ml
									PC54.101	ANCA contrôle aspect P-ANCA Bouchon rouge : solution incolore.Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium <0,1 % (conservateur)	

REMARQUE : Les autres composants des kits, notamment les réactifs communs (contrôles négatifs, milieu de montage, etc.) sont décrits ci-dessous, dans la section 8 RÉACTIFS COMMUNS.

8. RÉACTIFS COMMUNS

a. Réactifs communs

Réf.	Réactif	Quantité / Volume		Description	Prêt à l'emploi
NCANCA	Contrôle négatif	1x	0,5 ml	Capuchon vert : solution incolore. Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium < 0,1 % (conservateur)	OUI
*** EBIFA**	Bleu d'Evans 0,2 %	1x	1,5 ml	Capuchon banc : solution bleue Contenu : PBS, bleu d'Evans. Diluer le bleu d'Evans 0,2 % selon une proportion 1:3000 dans 1 WBIFA	NON
MMIFA	Milieu de montage	1x	8 ml	Validé pour une utilisation avec HELMED® Capuchon banc : solution incolore Contenu : PBS, glycérine.	OUI
WBIFA	Tampon de Lavage (10x)	1x	100 ml	Capuchon banc : solution incolore Diluer le tampon concentré selon une proportion 1:10 dans de l'eau distillée (par ex. 100 mL + 900 mL). Contenu : PBS, azoture de de sodium (conservateur).	NON
SBIFA	Tampon de Echantillons (1x)	1x	70 ml	Capuchon banc : solution incolore pour la dilution des sérums de patients Contenu : BSA, PBS, azoture de de sodium (conservateur).	OUI

Les quantités sont indiquées par kit. (*) doivent être commandés séparément.

b. Matériel nécessaire mais non fourni

1. Eau distillée
2. Tubes à essai pour la dilution des échantillons
3. Fiole jaugée
4. Pipette volumétrique
5. Minuteur
6. Microscope à fluorescence doté d'un système FITC (filtre d'excitation à 490 nm, filtre écran à 510 nm)
7. Plateau d'incubation
8. Cuve de coloration
9. Pointes de pipetage
10. Lames couvre-objet (24 x 60 mm)
11. presser pissette

Si les informations sur le produit, y compris l'étiquetage, sont défectueuses ou incorrectes, contacter le fabricant ou le fournisseur du kit de test.

9. Stockage et durée de conservation

Conserver tous les réactifs à une température de 2-8 °C / 35,6-46,4 °F, à l'abri de la lumière intense. La date de péremption de chaque composant est indiquée sur l'étiquette correspondante. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.

Conserver tous les réactifs et les lames à une température de 2-8 °C / 35,6-46,4 °F, dans leurs conteneurs d'origine. Une fois préparées, les solutions reconstituées sont stables pendant au moins 1 semaine à une température de 2-8 °C / 35,6-46,4 °F. **Les réactifs et les lames doivent être utilisés avant la date de péremption indiquée sur chaque composant**.

10. Précautions d'emploi

c. Données relatives aux risques pour la santé

CE PRODUIT EST EXCLUSIVEMENT RESERVE A UN USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO. Seul un personnel qualifié et spécialement formé dans le domaine du diagnostic in vitro peut utiliser ce kit. Bien que les réactifs contenus dans ce kit ne soient pas considérés toxiques ou dangereux pour la santé si les conditions d'usage sont respectées, les recommandations et précautions suivantes doivent être observées pour la sécurité maximale de l'utilisateur:

Recommandations et précautions

Ce kit contient des composants potentiellement dangereux. Bien que les réactifs du kit ne soient pas classé comme irritants pour les yeux et la peau, il est recommandé d'éviter tout contact avec les yeux et la peau et de porter des gants jetables.

Toutes les substances d'origine humaine utilisées dans certains réactifs de ce kit (contrôles, par exemple) ont été analysées avec des méthodes homologuées et les résultats ont montré qu'elles étaient négatives en ce qui concerne l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs), le virus de l'hépatite C et le VIH. Toutefois, aucun test ne peut garantir l'absence complète d'agents viraux dans ces substances. Par conséquent, il est nécessaire de manipuler les contrôles du kit et les échantillons de patients comme s'il s'agissait de transmetteurs potentiels de maladies infectieuses et conformément aux conditions requises au niveau national.

Le kit de cet essai contient du matériel d'origine animale (BSA, immunoglobuline) comme l'indique le chapitre „contenu du kit", veuillez l'utiliser conformément aux conditions requises au niveau national.

d. Règles générales pour l'utilisation

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer pendant le travail avec ce kit.
2. Ne pas mélanger ou substituer des réactifs ou lames de lots différents. Cela pourrait conduire à une variation des résultats.
3. Bien refermer tous les flacons après l'emploi pour éviter les contaminations bactériennes.
4. Toujours pipeter chaque composant avec des nouveaux embouts stériles.
5. Ne jamais exposer les composants de ce kit à une température supérieure à 37 °C / 98,6 °F (sauf MMIFA).
6. Toujours veiller à ce que les lames ne sèchent pas tout au long du déroulement de ce test.
7. Ne jamais congeler les lames!

Chaque laboratoire devrait établir son propre domaine normal basé sur ses propres techniques, contrôles, équipement et population de patients selon ses propres procédures établies.

Un diagnostic clinique définitif ne doit pas être basé uniquement sur les résultats de l'essai réalisé, mais il doit être élaboré par le médecin après avoir évalué tous les résultats cliniques et des laboratoires.

Si les résultats de l'essai ne se trouvent pas dans la plage de valeurs acceptables définie par le matériel de contrôle, le test n'est pas valable et doit être répété. Veuillez vérifier les éléments suivants : la date de péremption des réactifs (employés), les conditions de stockage, les pipettes et autre matériel utilisé, le photomètre, les temps d'incubation et la méthode de lavage.

Si vous n'avez pas décelé d'erreur lors de la vérification des éléments cités ci-dessus, veuillez contacter le fabricant ou le fournisseur du kit.

11. Recueil d'échantillons, manipulation et stockage

Utiliser de préférence des échantillons de sérum frais ou récemment prélevés. L'extraction de sang doit être conforme aux conditions requises au niveau national. Prélever les échantillons de sang de manière aseptique.

Ne pas utiliser d'échantillons lipémiques, ictériques, hémolysés ou contaminés par des bactéries.

Les sérums avec des particules doivent être purifiés par centrifugation à basse vitesse (<1000 x g). Les échantillons de sang doivent être recueillis dans des tubes propres, secs et vides. Après la séparation, les échantillons de sérum doivent être utilisés dans les 8 heures. Ils peuvent être stockés jusqu'à deux semaines bien fermés à une température comprise entre 2–8 °C / 35,6-46,4 °F ou congelés à -20 °C / -4 °F pour les périodes plus longues. Éviter les congélations et décongélations répétées.

12. Procédure du test

e. Préparation

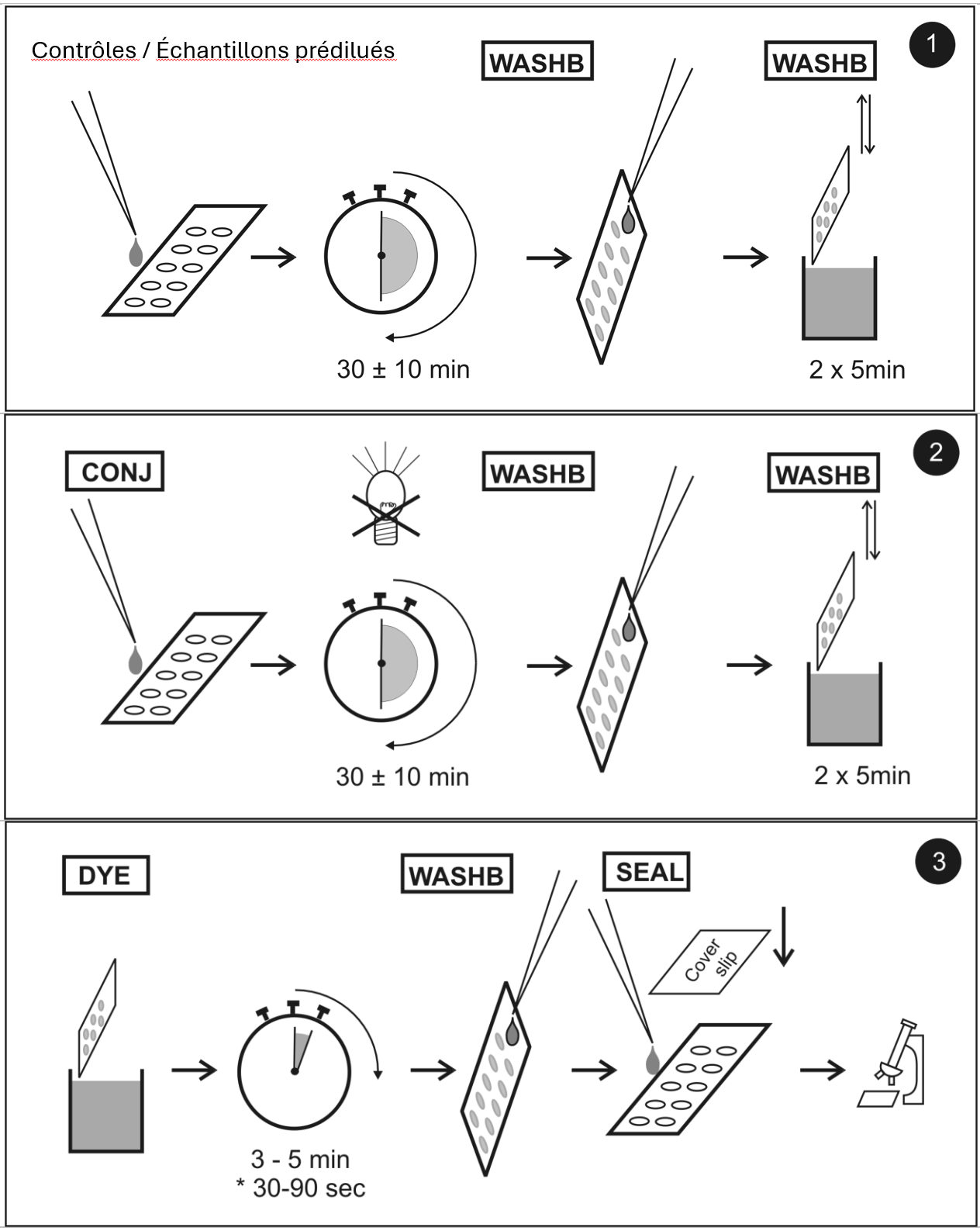
Amener tous les composants à température ambiante (20-26 °C / 67-78,8 °F) avant usage et bien les mélanger. Respecter le temps d'incubation recommandé pour chaque composant afin d'obtenir un résultat optimal.

1. Préparation de Tampon de Lavage: diluer le tampon concentré à 1:10 avec de l'eau distillée.
2. Dilution des échantillons : diluer le sérum du patient (pour la concentration de dépistage, se reporter à la section ***Procédure de test avec le kit*** ci-dessus en fonction de la référence de produit utilisé) avec un tampon d'échantillon 1x. Les concentrations des kits HEp-2, nDNA, rLKS, EMA, etc. sont différentes.
3. Les contrôles sont prêts à l'emploi.
4. Élaborer un protocole : les fiches d'interprétation des données sont disponibles dans la section ***Procédure de test avec le kit*** en fonction de la référence de produit utilisée.
5. En cas d'augmentation de la viscosité et/ou de l'opacité, le réactif et milieu de montage MMIFA doit être chauffé au bain-marie pendant 15 minutes à 56 °C / 132,8 °F, puis amené à température ambiante (20-26 °C / 68-78,8 °F) avant utilisation. Après cette procédure, le réactif chauffé peut être utilisé pendant 21 jours consécutifs à condition d'être conservé entre 2-8°°C / 35,6-46,4 °F, tel que précisé sur l'étiquette et dans le mode d'emploi du réactif.

f. Réalisation du test

N°	Description des étapes
1.	Compter le nombre de lames qu'il faudra pour réaliser le test. Retirer les lames nécessaires de leur emballage de protection et les marquer à l'aide d'un crayon. Éviter de toucher les puits. Veiller à ce que les lames ne sèchent pas tout au long du déroulement du test.
2.	**Préparation du Plateau d'incubation:** Placez un petit volume d'eau déminéralisée ou déionisée dans un plateau d'incubateur et placez la lame(s) sur les supports dans le plateau d'incubateur. Incuber les lames 30 ± 10 minutes à température ambiante dans le plateau d'incubation humide. Utiliser des temps d'incubation du conjugué cohérents. **Première incubation:** Pipeter une quantité suffisante de chaque sérum dilué et de contrôles (prêts à l'emploi) dans les puits appropriés ; éviter tout contact direct de la pipette avec la surface de la lame. Éviter un contact direct de l'embout de la pipette avec la surface de la lame. S'assurer que chaque puits est complètement recouvert avec le sérum correspondant ou le contrôle. Pour cela, il est important d'utiliser autant de matériel qu'il sera nécessaire. Mais éviter le débordement des échantillons de sérum entre les puits, car cela peut fausser les résultats.
3.	**Lavage :** Après incubation, retirer les lames du plateau d'incubation et rincer brièvement avec le tampon de lavage en utilisant une bouteille de lavage à pression. Ne pas injecter de tampon directement sur les puits. NOTEZ : Afin de prévenir les contaminations croisées incliner d'abord les lames sur un côté, puis appliquer un courant de tampon de lavage délicatement le long du milieu de la lame. Puis incliner la lame sur l'autre côté et répéter cette procédure de lavage. Laver les lames 10 minutes avec les tampon de lavage dans un bac de marquage de lames. Eviter tout contact d'élements solides avec le substrat. Pour un résultat optimal changer la solution de tampon après 5 minutes. Retirer les lames du bac et retirer délicatement l'excès de tampon de lavage. NOTEZ : Il est important que les puits des lames de s'assèchent pas durant la procédure car cela peut endommager le substrat. Merci de ne pas sécher la lame ou la laisser sans réactif fluorescent plus de quelques secondes.
4.	**Deuxième incubation**: Après le lavage, remettre immédiatement la lame dans la chambre humide et recouvrir chaque puits avec 30 µl de conjugué FITC prêt à l'emploi. Incuber les lames 30 ± 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité
5.	**Lavage:** Après incubation, retirer les lames du plateau d'incubation et rincer brièvement avec le tampon de lavage en utilisant une bouteille de lavage à pression. Ne pas injecter de tampon directement sur les puits.Laver les lames 10 minutes avec les tampon de lavage dans un bac de marquage de lames. Pour un résultat optimal changer la solution de tampon après 5 minutes.
6.	***Contre-coloration facultative :** Diluer le contre-colorant (Bleu d'Evans) dans une proportion 1:3000 dans le tampon de lavage et bien mélanger. Incliner le contre-colorant dans le bac de coloration et incuber les lames dedans. Se reporter à la section ***Procédure de test avec le kit*** ci-dessus en fonction de la référence produit utilisée pour obtenir des détails sur la durée de l'incubation. Le Bleu d'Evans couvre une fluorescence de fond non spécifique. Après le temps d'incubation, retirer la lame et la rincer brièvement avec la solution de lavage. Éliminer les excès de solution de lavage avec précaution. Ne pas sécher les lames avec du papier absorbant. Les lames ne doivent jamais se dessécher.
7.	**Montage**: Mettre une quantité suffisante de liquide de montage (mounting medium) le long de la ligne médiane de la lame. Faire glisser avec précaution la lamelle couvre-objet sur le liquide de montage en évitant la formation de bulles d'air.
8.	**Lecture au microscope**: Lire immédiatement la lame à l'aide d'un microscope à fluorescence avec un agrandissement de 400 à 800 fois (filtre d'excitation de 490 nm, filtre barrière de 510 nm).

g. Procédure


Contrôles / Échantillons prédilués
WASHB
WASHB
1
30 ± 10 min
2 x 5min
CONJ
WASHB
WASHB
2
30 ± 10 min
2 x 5min
DYE
WASHB
SEAL
3
Cover slip
3 - 5 min
* 30-90 sec

13. DÉPANNAGE

ERREUR	CAUSES POSSIBLES	SOLUTION
Faible densité des cellules	Lyse des cellules due au contact avec de l'eau déionisée Tampon éclaboussé directement sur les cellules	Respecter les conditions de lavage recommandées
	Les enzymes protéolytiques ont attaqué le substrat.	Désactiver le sérum
Fluorescence irrégulière	Le sérum a séché dans les puits, la fluorescence est plus forte sur les bords	Toujours incuber dans un environnement humide
	sérum ne recouvre pas le puits	Utiliser un volume suffisant de matériel du test
	Réactions croisées entre les puits	Éviter un débordement des échantillons entre les puits lors de la première incubation
	Le marquage d'une lame avec un crayon de cire produit un film	Utiliser un crayon sans cire
	Microscope mal ajusté	Vérifier le réglage Vérifier la durée de vie de la lampe UV
Image diffuse	Lame conservée au réfrigérateur sans couvercle	Sceller la lamelle couvre-objet avec du vernis à ongles ou de la cire de paraffine
	Microscope I.F. sali. Rayures/ éraflures possibles sur la lentille	Nettoyer le microscope conformément au mode d'emploi
Faible fluorescence ou pas de fluorescence	Conjugué et lame congelés et décongelés	Conserver les conjugués et les lames à 2-8 °C / 35,6-46,4 °F
	Les contrôles ont été dilués	Vérifier le mode d'emploi, utiliser les contrôles du kit qui sont prêts à l'emploi
	• Contamination bactérienne des sérums ou conjugués • Microscope pas ajusté • Le pH de la solution de lavage est trop faible (pH: 7,4 ± 0,2)	Vérifier les conditions
	Conjugué FITC exposé à la lumière	Conserver le conjugué à l'abri de la lumière
Fluorescence de fond (background fluorescence)	• Mauvais lavage • La lame a séché • Sérums lipémiques, hémolysés • Erreur au niveau du microscope	• Vérifier les instructions de lavage • Ne jamais laisser sécher les lames • Utiliser des sérums frais • Vérifier les filtres / l'objectif

14. SYMBOLES RÉGLEMENTAIRES

IVD	- Diagnosi in vitro	- For in vitro diagnostic use
	- Pour diagnostic in vitro	- Para uso diagnóstico in vitro
	- In-vitro-Diagnostikum	- In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	- Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	- Numero d'ordine	- Cataloge number
	- Référence Catalogue	- Numéro de catálogo
	- Katalognummer	- Αριθμός παραγγελίας
	- Número de catálogo	
LOT	- Descrizione lotto	- Lot
	- Lot	- Lote
	- Chargen Bezeichnung	- Χαρακτηρισμός παρτίδας
	- Lote	
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo	- Unique device identifier
	- Identifiant unique de l'appareil	- Identificador único del dispositivo
	- eindeutige Produktidentifizierung	- Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	- Identificador único do dispositivo	
CE	- Conformità europea	- EC Declaration of Conformity
	- Déclaration CE de Conformité	- Declaración CE de Conformidad
	- Europäische Konformität	- Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- Declaração CE de conformidade	
eIFU WWW.AESKU.COM	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso	- See electronical instructions for use
	- Voir les instructions d'utilisation électronique	- Siga las instrucciones electrónicas de uso
	- Elektronsiche Gebrauchsanweisung beachten	- Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Seguir as instruções electrónicas de utilização	
	- Da utilizzarsi entro	- Use by
	- Utilise avant le	- Utilizar antes de
	- Verwendbar bis	- Χρήση μέχρι
	- Utilizar antes de	
+2°C +8°C	- Conservare a 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conserver à 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Conservar a 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Lagerung bei 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Φυλάσσεται στους 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conservar entre 2-8°C (35.6-46.4°F)	
	- Prodotto da	- Manufactured by
	- Fabriqué par	- Fabricado por
	- Hergestellt von	- Κατασκευάζεται από
	- Fabricado por	
DYE	- Colorante Blue-Evans	- Evans-Blue Dye
	- coloration au Bleu Evans	- Colorante Azul de Evans
	- Evans-Blue Färbelösung	- Evans Blue
	- Evans Blue	
CONTROL +	- Controllo positivo	- Positive Control
	- Contrôle Positif	- Control Positivo
	- Positiv Kontrolle	- Θετικός ορός ελέγχου
	- Controlo positivo	
CONTROL −	- Controllo negativo	- Negative Control
	- Contrôle Négatif	- Control Negativo
	- Negativ Kontrolle	- Αρνητικός ορός ελέγχου
	- Controlo negativo	
SEAL	- Mezzi di montaggio	- Mounting media
	- milieu de montage	- Medio de montaje
	- Mounting Medium	- Μέσο μονιμοποίησης
	- Meio de montagem	
CONJ	- Coniugato	- Conjugate
	- Conjugé	- Conjugado
	- Konjugat	- Σύζευγμα
	- Conjugado	
	- Vetrino per microscopio	- Microscope slide
	- lame de microscope	- Portaobjetos
	- Objektträger	- Αντικειμενοφόρο πλακίδιο
	- Lâmina	
WASHB 10x	- Tampone di lavaggio	- Wash Buffer
	- Tampon de Lavage	- Solución de lavado
	- Waschpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	- Solucão de lavagem	
SB 1x	- Tampone di campione	- Sample Buffer
	- Tampon de Echantillons	- Solución de muestras
	- Probenpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	- Solução para amostras	

	- Numero di determinazioni	- Number of determnations
	- Nombre de déterminations	- Número de determinaciones
	- Anzahl der Prüfungen	- Αριθμός προσδιορισμών
	- Número de determinações	
	- Non riutilizzare	- Do not reuse
	- Ne pas réutiliser	- No reutilizar
	- Nicht wiederverwenden	- Μην επαναχρησιμοποιείτε
	- Não reutilizar	
	- Proteggere dall'esposizione alla luce	- Protect from exposure to light
	- Protéger de l'exposition à la lumière	- Proteger de la exposición a la luz
	- Vor Sonnenlicht schützen	- Προστασία από την έκθεση στο φως
	- Proteger da exposição à luz	
	- Conservare all'asciutto	- Store dry
	- Stocker au sec	- Almacenar en seco
	- Trocken aufbewahren	- Αποθηκεύστε ξηρά
	- Armazenar em local seco	
	- Non utilizzare se la confezione è danneggiata e consultare le istruzioni per l'uso	- Do not use if package is damaged and consult instructions for use
	- Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter le mode d'emploi.	- No utilizar si el envase está dañado y consultar las instrucciones de uso
	- Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist, und Gebrauchsanweisung beachten	- Μην χρησιμοποιείτε εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά και συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης.
	- Não utilizar se a embalagem estiver danificada e consultar as instruções de utilização	