



A.MENARINI
diagnostics

Système de test par anticorps anti-endomysial (EMA)

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 37790 Test de détection des Anticorps Anti-endomysiaux (Muscle lisse de singe) 48 Tests

REF 37810 Test de détection des Anticorps Anti-endomysiaux (Muscle lisse de singe) 6 Puits

UTILISATION PRÉVUE

Test d'immunofluorescence indirecte pour la recherche qualitative et semi-quantitative d'anticorps anti-endomysial (EMA) dans le sérum humain servant de support dans le cours du diagnostic de la maladie cœliaque et de la dermatite herpétiforme.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les anticorps anti-endomysial (EMA), comme le signale la littérature scientifique, sont détectés à l'origine sur le muscle lisse d'œsophage du singe par immunofluorescence indirecte. La détection des EMA fournit une aide dans le diagnostic de l'entéropathie sensible au gluten, c'est-à-dire la *maladie cœliaque* (CD) et la *dermatite herpétiforme* (DH). Les patients atteints de ces deux maladies apparaissent dotés d'anticorps à l'endomysium, à la réticuline et à la gliadine¹⁻¹². Ces marqueurs sérologiques ont été récemment incorporés au sein des critères révisés pour le diagnostic de la maladie cœliaque par la Société européenne de gastroentérologie pédiatrique et de nutrition¹³. Parmi les différents marqueurs d'anticorps de la maladie cœliaque et de la dermatite herpétiforme, les EMA de la classe IgA semble être les marqueurs les plus sensibles et les plus spécifiques. Les EMA de la classe IgG se manifestent également quand les EMA de la classe IgA se présentent sous une concentration élevée ou chez les individus qui présentent un déficit en IgA. Une baisse rapide des niveaux d'EMA se manifeste lorsque l'on suit un régime exempt de gluten. Un test de provocation au gluten ou un arrêt du régime exempt de gluten conduit à l'apparition ou à une augmentation des titres d'anticorps anti-endomysial. Les patients suivant un régime exempt de gluten depuis plus de 9 mois présentent des titres réduits ou négatifs d'EMA s'ils respectent les impératifs de leur régime^{1,6-8,10}.

PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Dans la méthode de l'immunofluorescence indirecte, le sérum du patient est incubé sur les sections du tissu pour permettre la liaison des anticorps au substrat. Tous les anticorps non liés sont éliminés par un rinçage. Les anticorps liés de la classe IgA et IgG sont détectés par incubation du substrat avec un conjugué d'anticorps à marquage fluorescéine pour l'IgG humain. Les réactions sont observées sous un microscope à fluorescence équipé de filtres appropriés. La présence d'EMA est démontrée par une fluorescence de couleur vert pomme du revêtement endomysial des faisceaux du muscle lisse. Le titre (la réciproque du nombre représentant la plus forte dilution pour laquelle une réaction positive est observée) de l'anticorps est ensuite déterminé en testant des dilutions en série¹⁴.

INFORMATION SUR LE PRODUIT

Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8°C. Les réactifs sont prêts à l'usage après un équilibrage à température ambiante.

Matériel fourni

Menarini™ Anticorps Endomysiaux EMA **REF** 37790

8 x **SORB** **SLD** **6**

Lames 6 puits avec substrat d'oesophage de singe

1 x 0.5 ml **CONTROL** + **EMA** *

Contrôle positif EMA. Contient sérum humain.


 1 x 0.5 ml **CONTROL -** *

 1 x 5 ml **IgA/IgG-CONJ FITC EB** *

 1 x 60 ml **BUF** *

 2 fioles **BUF WASH**

 1 x 5.0 ml **MOUNTING MEDIUM** *

 1 x 12 **COVER SLD**
Composants en option

 1 x 5 ml **IgA/IgG-CONJ FITC** *

 1 x 1.0 ml **EVANS**

 * Contient < 0.1% NaN₃
Symboles utilisés sur les étiquettes:

Numéro de lot

Numéro de référence catalogue

A utiliser avant

Température de conservation

Lire les instructions d'utilisation

Pour usage diagnostique In vitro

Fabricant

Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Boîte de coloration (p. ex. Tube de Coplin)
- Petites éprouvettes (par exemple 13 x 75 mm) et râtelier d'éprouvettes de test
- Eau distillé ou désionisée
- récipient de 1 litre
- Flacon-laveur
- Serviettes de papier absorbant
- Chambre d'incubation

Contrôle négatif. Contient sérum humain.

Conjugué FITC anti-IgG humaines. Contient coloration d'Evans.
Maintenir à l'abri de la lumière.

Diluant sérum.

Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre.

Milieu de montage. Ne pas congeler.

Lamelles couvre-lames.

38006. Conjugué anti-IgG hum. FITC. Maintenir à l'abri de la lumière.

38014 Contre-colorant Bleu d'Evans



AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Destiné à un usage diagnostique in vitro Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Tous les échantillons de sérum humain et les substances dérivées de l'être humain devraient être traités comme étant potentiellement dangereux, sans égard pour leur origine. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux¹⁴.

AVERTISSEMENT – L'azide de sodium (NaN_3) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue d'A. Menarini Diagnostics S.r.l.. Ne pas utiliser après l'expiration de la date de péremption.

RÉCOLTE DES SPÉCIMENS ET MANIPULATION

Seuls des échantillons de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des échantillons grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les échantillons à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les échantillons de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROCÉDURE

Méthode de test

A. Dépistage

1. Diluer chaque échantillon patient 1:2.5 avec la solution de dilution fournie (0,2 ml sérum + 0,3 ml diluant). Ne pas diluer les régulateurs positif ou négatif. Conserver du sérum non dilué pour déterminer des titres d'anticorps si les tests de dépistage apparaissent être positifs.
2. Laisser les sachets qui contiennent les lames de substrat atteindre la température ambiante pendant 10-15 minutes. Retirer avec soin les lames sans toucher le substrat.
3. Étiqueter les lames et les placer dans une chambre d'incubation entourée de serviettes en papier humidifiées avec de l'eau pour empêcher le séchage.
4. Renverser la fiole compte-gouttes et appuyer doucement pour appliquer 1 goutte (approximativement 50 µl de régulateur négatif) au puits #1. De la même façon, appliquer 1 goutte de régulateur positif au puits #2. Éviter de faire déborder les puits.
5. En utilisant une micropipette ou une pipette Pasteur, appliquer 1 goutte de sérum de patient dilué (approximativement 50 µl) aux autres puits. Éviter de faire déborder les puits.
6. Placer le couvercle sur la chambre d'incubation et incuber les lames pendant 30 minutes à température ambiante.
7. Retirer une lame de la chambre d'incubation. Tenir la lame par l'extrémité et rincer doucement avec approximativement 10 ml de PBS en utilisant une pipette, ou rincer la lame dans un vase à bec rempli de PBS. Ne pas utiliser de flacon-laveur. Transférer immédiatement la lame dans le tube de Coplin et laver pendant 10 minutes. Refaire le même processus avec toutes les lames restantes.
8. Enlever les lame(s) du tube de Coplin. Sécher le bord de la lame sur une serviette en papier pour enlever le PBS en excédent. Placer la lame dans la chambre d'incubation. Renverser immédiatement la fiole compte-gouttes de conjugué et appuyer doucement pour appliquer 1 goutte (approximativement 50 µl) à chaque puits.



9. Recommencer les étapes **7 et 8** pour chaque diapositive.
10. Remettre le couvercle sur la chambre d'incubation. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
11. Retirer une lame de l'incubateur. Tenir la lame par une extrémité et tremper la lame dans un bécher contenant du PBS pour éliminer le conjugué en excédent. Placer les lames dans une boîte de coloration remplie de PBS pendant 10 minutes. Si on veut, 2-3 gouttes de coloration de contraste bleu Evans peuvent être ajoutées au lavage final Recommencer l'opération pour les lames restantes. NOTE : Un lavage inadéquat peut mener à une fluorescence de fond augmentée
12. Retirer une lame de la boîte de coloration. Sécher le bord de la lame sur une serviette en papier pour enlever le PBS en excédent **Pour empêcher le séchage de la lame, poursuivre immédiatement en réalisant l'étape suivante pendant que la lame est encore mouillée.**
13. Monter la lamelle de protection en appliquant 3 gouttes de milieu de montage sur la lamelle de protection et placer la lamelle de protection sur la lame. Éviter d'exercer une pression indue et éviter tout mouvement latéral de la lamelle de protection.
14. Recommencer les étapes 12 et 13 pour chaque lame.
15. Rechercher la fluorescence spécifique sous un microscope à fluorescence avec un grossissement de 200x ou supérieur.

Les lames peuvent être lues dès qu'elles sont préparées. Cependant, en raison de la présence d'un agent antifading dans le milieu de montage, aucune perte significative de l'intensité de la coloration ne se produit si la lecture est effectuée après plus de 48 heures. Les lames doivent être stockées à l'obscurité à 2-8°C.

B. Détermination du critère d'évaluation (titrage)

Un sérum positif dans le test de dépistage peut être testé davantage en suivant les étapes 5 à 13 pour déterminer le titre. Chaque passage du test doit inclure les régulateurs positifs et négatifs. Faire des dilutions en double en série qui commencent à 1:2.5. La réciproque du nombre de la dilution la plus forte produisant une réaction positive correspond au titre.

Préparation des dilutions en série

Numéroter quatre éprouvettes de 1 à 4. Ajouter 0,3 ml de diluant d'échantillon à l'éprouvette 1 et 0,2 ml aux éprouvettes de 2 à 4. Pipeter 0,2 ml de sérum non dilué dans l'éprouvette 1 et mélanger soigneusement. Transférer 0,2 ml du tube 1 au tube 2 et mélanger soigneusement. Continuer à transférer 0,2 ml d'une éprouvette à l'autre après avoir mélangé pour produire les dilutions figurant dans le tableau suivant :

Éprouvettes	1	2	3	4
Sérum	0.2 ml			
	+			
Solution de dilution	0.3 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Transfer		↺ 0.2 ml	↺ 0.2 ml	↺ 0.2 ml
Dilution finale	1:2.5	1:5	1:10	1:20 etc.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un régulateur positif et un régulateur négatif doivent être inclus à chaque étape du test. Le régulateur négatif ne doit pas présenter de fluorescence spécifique du revêtement de l'endomysium des faisceaux de muscles lisses, alors que le régulateur positif doit présenter une intensité de coloration 2+ ou supérieure des tubules de ces structures.

Si les résultats attendus ne sont pas obtenus, l'opération doit être recommencée. Si des résultats inadéquats continuent à se manifester avec les régulateurs, cela peut être dû à :

- Turbidité. Jeter et utiliser un autre contrôle

- Problèmes avec le système optique du microscope à fluorescence. Ceux-ci peuvent comprendre : alignement incorrect, ampoule au-delà de sa durée de vie prévue, etc.,
- Permettre à la lame de sécher pendant la procédure.

RÉSULTATS

Les résultats des tests pour les anticorps anti-endomysial doivent être rapportés comme étant négatifs (< 2,5), positifs (supérieur ou égal à 20) ou préférablement, positifs avec titre.

Lire la coloration spécifique du revêtement de l'endomysium des faisceaux de muscles lisses. **Voir la Photo 1.** Les anticorps anti-endomysial réagissent comme un réseau de lignes minces, irrégulières autour du sarcolemme des fibrilles du muscle lisse individuel. Ceci est en net contraste avec les anticorps anti-muscle lisse qui réagissent avec le sarcoplasme. **Voir Photo 2.**

D'autres anticorps détectables en plus des anticorps anti-muscle lisse (ASMA) comprennent les anticorps antinucléaires (ANA). On sait que la présence d'ASMA pour provoquer de faux résultats négatifs pour les anticorps anti-endomysial. Si des ASMA sont détectés, alors l'échantillon doit être testé à des dilutions plus élevées¹. Les réactions ANA sur les tissus du muscle lisse, quand elles se produisent, sont habituellement faibles et peu distribuées et, par conséquent, peu en mesure d'engendrer de faux résultats négatifs.

Consulter les photos 1 2 à la fin du présent document pour consulter des réactions d'exemple.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Dans certains cas, le sérum positif pour les EMA peut être très faible ou négatif à la dilution de dépistage initiale (phénomène de prozone). Dans de tels cas douteux, le sérum doit être testé à des dilutions plus élevées et, s'il est positif, le titre de l'anticorps doit être déterminé.

La présence de deux ou plusieurs anticorps dans un sérum qui est réactif avec le même tissu peut provoquer une interférence pour leur détection par immunofluorescence. Cette interférence peut causer soit l'absence de détection des EMA soit une suppression de son titre si l'anticorps en interférence présente un titre plus élevé qu'EMA. La cause la plus commune du phénomène d'interférence dans les tests d'EAM est la coexistence d'anticorps du muscle lisse. Il est recommandé que le sérum des patients qui contient aussi des ASMA soit testé davantage à des dilutions plus élevées. Des ASMA de la classe IgA ne sont pas très fréquents. Les anticorps ASMA de la classe IgG ne bloquent pas les anticorps anti-endomysial EMA-IgG dans la mesure où les premiers réagissent avec le sarcoplasme des faisceaux du muscle lisse et les seconds réagissent avec l'endomysium du sarcolemme autour des faisceaux du muscle lisse. Les anticorps anti-réticuline n'entrent pas en interférence avec la réaction des anticorps EMA parce qu'ils ne réagissent pas avec le tissu du muscle lisse du primate. La coexistence d'anticorps EMA de la classe IgG peut rentrer en interférence avec la détection des anticorps de la classe IgA. Cependant, cela se produit rarement dans la mesure où :

1. Les anticorps EMA de la classe IgG sont présents chez seulement 25% des patients atteints de maladie cœliaque,
2. Les titres des EMA de la classe IgG sont habituellement de loin inférieurs aux titres des EMA de la classe IgA et
3. les anticorps IgA présentent généralement une avidité plus élevée que les autres anticorps IgG.

Chez certains patients souffrant de maladie cœliaque et de déficience en IgA, les anticorps anti-endomysial de la classe IgA sont absents. Cependant, ces patients sont habituellement positifs pour les EMA de la classe IgG.

Les patients présentant une maladie cœliaque, qui suivent un régime exempt de gluten pendant plus de 9 mois sont invariablement négatifs aux EMA.

Quand on pose un diagnostic, les résultats de tout test de laboratoire doivent toujours être évalués sur la base du passé clinique global du patient.

VALEURS ATTENDUES

Comme on le voit dans le tableau 1, les anticorps EMA, détectés sur le muscle lisse du primate, sont des marqueurs très spécifiques de la maladie cœliaque et de la dermatite herpétiforme. La présence d'EMA semble être en rapport avec la pathologie intestinale aussi bien dans la maladie cœliaque et dans la dermatite herpétiforme plutôt qu'avec les lésions de la peau de cette dernière, comme on le voit dans la Figure 1.


DONNÉES DE RENDEMENT

Le kit de test des anticorps anti-endomysial (EMA) Menarini™ (EAM) , en utilisant un substrat de muscle lisse de primate et un conjugué polyvalent , a été comparé avec un autre équipement qui est disponible dans le commerce, lequel utilise aussi un conjugué polyvalent et l'œsophage de singe en guise de substrat. La comparaison a porté sur un total de 68 sérums : 20 provenant de patients présentant une maladie cœliaque cliniquement suspectée et 48 provenant de contrôles normaux. Ces sérums ont été testés d'après la procédure recommandée par le fabricant. Une dilution de dépistage de 2,5 a été utilisée et tout le sérum positif aux EMA a été titré au critère d'évaluation. Les résultats sont les suivants :

		Menarini™ EMA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Autre EMA IFA	POS (+)	18	0	18
	NEG (-)	2	48	50
	TOT (=)	20	48	68
spécificité relative:		97%		
sensibilité relative:		100%		
concordance:		96%		



Photo 1. EMA staining reaction on primate smooth muscle, 200X. Note staining of lining of the smooth muscle bundles.

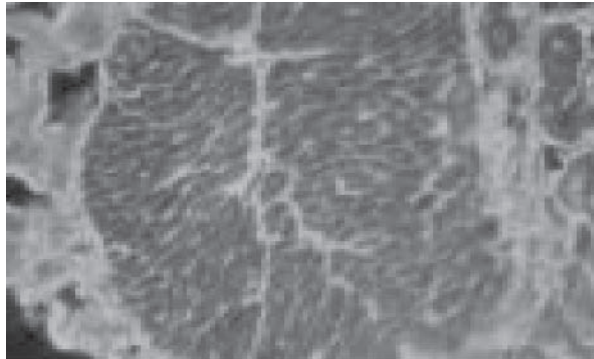


Photo 2. ASMA staining reaction on primate smooth muscle, 200X. Note staining of the smooth muscle sarcoplasm.

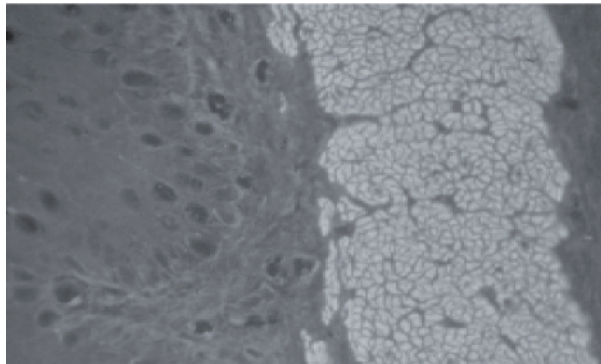
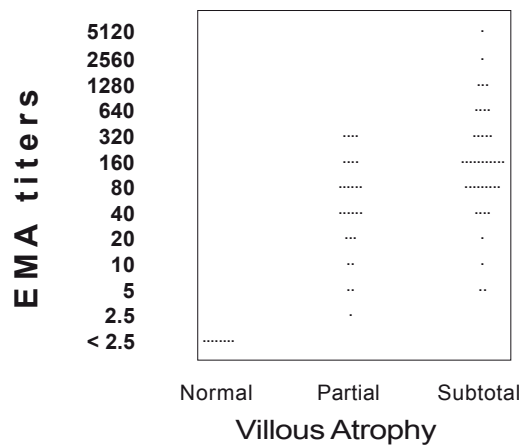


Figure 1: Correlation of IgA-EMA titers in Villous Atrophy



From Chorzelski TP et al¹ and Kumar V et al⁶



Table 1. Incidence of IgA Class EMA

Clinical Condition	No. Tested	% Positive
Confirmed Celiacs		
On gluten	185	99
On gluten free diet	190	9
Suspected Celiacs		
On gluten	82	83
On gluten free diet	30	16
Dermatitis Herpetiformis (DH)	253	80
DH with Subtotal Villous Atrophy	42	100
DH on gluten free diet	36	3
Disease Controls (GI)		
Infectious Diarrhea	210	0
Recurrent Diarrhea	124	0
Toddlers Diarrhea	170	0
Milk Protein Intol.	69	0
Ulcerative Colitis	69	0
Crohn's Disease	65	0
Liver Diseases	21	0
Disease Controls (Skin)		
Linear IgA Bullous Dermatitis	4	0
Other Skin Diseases	180	0

Compiled from the literature as per Chorzelski TP et al¹.



 **A. Menarini Diagnostics S.r.l.**
via Sette Santi 3
50131 Firenze
Italia

EL

Διανέμεται στην
ΕΛΛΑΔΑ από την
A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argyroupolis
Attiki

AT

ÖSTERREICH
Vertrieb durch
A. Menarini Ges.m.b.H
Pottendorfer Straße, 25/27
A - 1120 Wien

BE

BELGIQUE
Distribué par
A. Menarini Diagnostics
Benelux S.A./N.V.
Belgicastraat, 4
1930 Zaventem

PT

PORTUGAL
Distribuido por
A. Menarini Diagnósticos, Lda
Quinta da Fonte
Edifício D.Manuel I, 2ºB
2770-203 Paço de Arcos

NL

NEDERLAND
Distributed by
A. Menarini Diagnostics
Benelux N.V.
De Haak, 8
5555 XK Valkenswaard

Date of issue: March 2007
Data de publicação: Março de 2007
Ausgabedatum: März 2007
Date d'émission : Mars 2007
Ημερομηνία έκδοσης: Μάρτιος 2007

Document No. PI4114 M

