



A.MENARINI
diagnostics

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 38060 Détection des Anticorps Anti-endomysiaux (EMA) (Parties d'Oesophage Distal de Singe) 48 Tests

REF 38059 Lamelle Oesophage Distal de Singe 8 Puits

Test par immunofluorescence indirecte pour la recherche et la détermination semi-quantitative des anticorps anti-endomysiaux (EMA) dans le sérum humain pour aider à diagnostiquer la maladie coeliaque et la dermatite herpétiforme.

GENERALITES

La détection des EMA est une aide pour le diagnostic de l'entéropathie sensible au gluten, c'est à dire la maladie coeliaque (CD), et de la dermatite herpétiforme (DH). Les patients souffrant de CD et de DH présentent des anticorps anti-endomysium, réticuline et gliadine et transglutaminase de tissu¹⁻¹². Ces marqueurs sérologiques ont été récemment incorporés dans les nouveaux critères de diagnostic de la CD par la European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition¹³. Les anticorps endomysiaux (EMA) peuvent être détectés par immunofluorescence indirecte sur muscle lisse de singe tel que le substrat oesophage distal compris dans ce kit. Parmi les différents anticorps témoins de la CD et de la DH, les EMA de la classe des IgA semblent être les marqueurs les plus sensibles et les plus spécifiques. Les EMA de la classe des IgG se retrouvent également lorsque les EMA de la classe des IgA ont un titre élevé ou chez les individus qui manquent de IgA. Une diminution rapide du niveau des EMA s'observe dès que le patient adopte un régime sans gluten. Une compétition du gluten ou un manque de persévérance dans le régime sans gluten fait réapparaître et augmenter les titres des anticorps anti-endomysiaux. Les patients suivant avec persévérance un régime sans gluten depuis plus de 9 mois présentent une réduction voire une disparition des EMA^{1, 6-8,10}.

PRINCIPES DE LA METHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce kit, le sérum du patient est incubé sur des substrats, ce qui permet la fixation des anticorps avec le substrat. Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué anti-IgA humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps de classe IgA fixés. Les réactions sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert pomme de la ligne endomysiale du faisceau des muscles lisses montre la présence d'anticorps EMA. Le titre du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé par dilutions sériques successives¹⁴.

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs entre 2°et 8°C. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Avant utilisation, attendre que les réactifs atteignent l'équilibre à la température ambiante du laboratoire.

Matériel fourni

Menarini™ Détection des Anticorps Anti-endomysiaux (EMA) (Parties d'Oesophage Distal de Singe) **REF** 38060

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 48 tests chacun.

6 x

SORB	SLD	8
------	-----	---

8 Lames avec substrat d'oesophage distal de singe.

1 x 0,5 ml

CONTROL	+	EMA
---------	---	-----

Contrôle positif EMA. Contient sérum humain.


 1 x 0,5 ml CONTROL - *
Contrôle négatif. Contient sérum humain.

 1 x 5 ml IgA-CONJ FITC EB *
Conjugué FITC anti-IgA humaines. Contient coloration d'Evans.
Maintenir à l'abri de la lumière.

 1 x 60 ml BUF *
Diluant sérum

 2 x BUF WASH
Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre.

 1 x 5,0 ml MOUNTING MEDIUM *
Milieu de montage. Ne pas congeler.

 1 x 12 COVER SLD
Lamelles couvre-lames
Composants en option

 1 x 5 ml IgA-CONJ FITC *
REF 38008 Conjugué anti-IgA hum. FITC. Maintenir à l'abri de la lumière.

 1 x 1,0 ml EVANS
REF 38014 Contre-colorant Bleu d'Evans.

 * Contient < 0.1% NaN₃
Symboles utilisés sur les étiquettes:
LOT Numéro de lot

REF Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant

 Température de conservation

 Lire les instructions d'utilisation

IVD Pour usage diagnostique In vitro

 Fabricant

 Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Bac à coloration pour le lavage des lames (bac Coplin)
- Petits tubes (ex : 13 X 75 mm) et porte-tubes
- Eau distillée ou déionisée
- Eprouvette graduée 1l
- Flacon pour solution de lavage
- Serviettes en papier
- Chambre d'incubation



MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage¹⁴.

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN_3). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit composants par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

MODE OPERATOIRE

A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:2.5 à l'aide du diluant échantillon fourni (0.2ml de sérum + 0.3ml de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des anticorps dans le cas où le dépistage serait positif.
2. Laisser les lames prendre la température du laboratoire pendant 10-15 minutes dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat.
3. Numéroter les lames et les placer dans la chambre humidifiée avec des serviettes en papier mouillées pour éviter le dessèchement.
4. Retourner le flacon doseur et appuyer doucement pour déposer 1 goutte (environ 50µl) de Contrôle Négatif sur le puit n°1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif sur le puit n°2. Eviter de déborder des puits.
5. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder des puits.
6. Replacer le couvercle sur la chambre et incuber les lames 30 minutes à température ambiante.
7. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette contenant environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un becher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
8. Retirer une (les) lame(s) du bac de coloration. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. Déposer la lame dans la chambre d'incubation. Retourner les flacons doseurs de conjugué et déposer immédiatement 1 goutte (environ 50µl) dans chaque puit.
9. Répéter les étapes 7 à 8 avec chaque lame.
10. Replacer le couvercle sur la chambre d'incubation et incuber 30 minutes à température ambiante.



11. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, plonger la lame dans un becher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration rempli de PBS pendant 10 minutes. Si un supplément de conjugué sans contre-coloration est utilisé (voir composé en option dans la Section Matériel Fourni), 2-3 gouttes de contre-coloration bleue d'Evans peuvent être ajoutée au lavage final. Répéter les opérations avec toutes les lames. REMARQUE: Un lavage incorrect peut augmenter le bruit de fond de fluorescence.
12. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. **Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est encore humide.**
13. Déposer doucement 3 **gouttes** de milieu de montage dans chaque puits et appliquer la lamelle couvre-lame. Ne pas appliquer de pression excessive et éviter les mouvements latéraux de la lamelle.
14. Répéter les étapes 12 et 13 avec chaque lame.
15. Observer la fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope au grossissement X200 ou plus.

Les lames peuvent être lues immédiatement. Cependant, grâce à la présence d'un agent anti-fading dans le milieu de montage, la lecture peut être retardée jusqu'à 48 heures sans perte significative de l'intensité de fluorescence. Dans ce cas les lames doivent être conservées à l'obscurité entre 2 et 8°C.

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les étapes 5 à 13 afin de définir son titre. Inclure dans chaque nouvelle série un contrôle positif et négatif. Les dilutions en série de 2 en 2 sont réalisées à partir du 1 : 2.5. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

Préparation des dilutions en série

Numéroter quatre tubes de 1 à 4. Ajouter 0.3 ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0.2 ml dans les tubes 2 à 4. Pipeter 0.2ml de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0.2 ml du tube 1 dans le tube suivant. Continuer à transférer 0.2 ml d'un tube à l'autre en mélangeant bien chaque tube pour arriver aux dilutions suivantes :

Tubes	1	2	3	4
Sérum	0,2 ml			
	+			
Diluant Echantillon	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		⇄	⇄	⇄
Transfert	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Dilution finale	1:2.5	1:5	1:10	1:20 etc.

CONTROLE DE QUALITE

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne doit pas donner d'image fluorescente de la ligne endomysiale du faisceau des muscles lisses tandis que le contrôle positif doit donner une fluorescence des tubules de ces structures.

Dans le cas où les contrôles ne donneraient pas les résultats attendus, il est recommandé de refaire le test. Si le problème persiste, cela peut être lié à:

- La turbidité. Eliminer le contrôle et en utiliser un nouveau.
- Au système optique du microscope. Par exemple: mauvais alignement, lampe ayant dépassé sa durée de vie, etc.
- A un assèchement des lames pendant la manipulation.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats des essais pour la recherche des anticorps EMA doivent être considérés négatifs (avec titre inférieur à 2.5) ou bien positifs (avec titre plus grand ou égal à 20), ou encore positifs avec un titre de point de virage spécifique.



Ne considérer que les champs comprenant une coloration spécifique de la ligne endomysiale du faisceau des muscles lisses. **Voir photo 1.** Les anticorps endomysiaux réagissent comme un réseau de fines lignes irrégulières autour du sarcolème de chaque fibrille de muscle lisse. Il y a donc une différence de forme avec les anticorps anti-muscle lisse qui réagissent avec le sarcoplasme. **Voir photo 2.**

Il y a d'autres anticorps détectables en plus des anticorps anti-muscle lisse (ASMA) tels que les anticorps anti-nucléaires (ANA). La présence des ASMA est une cause de faux négatif des anticorps endomysiaux. Si des ASMA sont découverts, l'échantillon doit être testé à des dilutions plus grandes ¹. Les réactions ANA sur les muscles lisses, lorsqu'elles se produisent, sont généralement faibles et éparpillées et, donc, ne causent pas de faux négatifs.

LIMITES D'UTILISATION

Parfois un sérum EMA positif peut donner un résultat faiblement positif ou négatif à la dilution de dépistage (effet de zone). Dans ces cas douteux, les sérums devront être testés à des dilutions supérieures et, si le résultat est positif, déterminer le titre des anticorps.

Parfois la présence de deux ou plus anticorps différents dans le sérum ayant une réactivité vis-à-vis du même substrat peut créer des interférences pour la détection en immunofluorescence. Cela peut masquer la détection des EMA ou cacher le titre si l'anticorps qui interfère a un titre plus élevé que celui des EMA. La cause la plus fréquente d'interférence dans les tests EMA est la coexistence d'anticorps des muscles lisses. Il est recommandé que les sérums des patients qui contiennent également des ASMA soient retestés à des dilutions plus grandes. Les ASMA de la classe IgA ne sont pas courants. Les ASMA de la classe des IgG ne bloquent pas les EMA IgA car ces premiers réagissent avec le sarcoplasme des muscles lisses et que ces derniers réagissent avec l'endomysium de la sarcolème se trouvant autour des faisceaux des muscles lisses. Les anticorps anti-réticuline n'interfèrent pas dans les réactions des EMA car ils ne réagissent pas avec les tissus des muscles lisses de singe.

Chez certains patients souffrant de CD et manquant de IgA, les anticorps endomysiaux de la classe des IgA sont absents. Ce qui entraîne que ce type de patients soit généralement positif pour les EMA de la classe des IgG.

Les patients souffrant de CD et suivant un régime sans gluten depuis plus de 9 mois seront négatifs au test de recherche des EMA.

Lors du diagnostic, les résultats du laboratoire doivent être évalués avec l'histoire clinique du patient.

VALEURS PREVUES

Comme indiqué dans le tableau 1, les EMA détectés sur les muscles lisses de singe sont des marqueurs très spécifiques de la maladie coeliaque et de la dermatite herpétiforme. La présence des EMA semble plus liée à une pathologie intestinale dans les deux cas de maladie qu'à des lésions de la peau dans la dernière comme décrit dans la figure 1.

PERFORMANCES

Le kit de test des anticorps anti-endomysiaux (EMA) Menarini™, utilisant du substrat d'oesophage distal de singe et un conjugué IgA, a été comparé avec un autre kit de détection des EMA du commerce. La comparaison comprend un total de 68 sérums : 20 provenant de patients suspectés de maladie coeliaque et 48 de contrôles normaux. Les sérums ont été testés selon les procédures recommandées par le fabricant. Un test de dilution 2.5 a été réalisé et tous les sérums positifs aux EMA ont été titrés. Les résultats sont les suivants:

		Menarini™ EMA		
		Positif (+)	Négatif (-)	Total (=)
Autres	Positif (+)	18	0	18
	Négatif (-)	2	48	50
	EMA IFA TOT (=)	20	48	68

Spécificité relative: 97%
 Sensibilité relative: 100%
 Concordance : 96%

REFERENCES • BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Chorzelski TP, Beutner EH, Kumar V and Zalewski TK (Eds). Serologic Diagnosis of Celiac Disease. CRC Press Boca Raton; 1990.
2. Levenson SD, Austin RK, Dietler MD, Kasarda DD and Kagnoff MF. Specificity of antigliadin antibody in celiac disease. Gastroenterology; 1985, 89:1-5.
3. Tucker NT, Barghuthy FS, Prihoda TJ, Kumar V, Kerner A and Lebenthal E. Antigliadin antibodies detected by enzyme linked immunosorbent assay as a marker of childhood celiac disease. J Pediatric; 1988, 113:286-289.
4. Hallström O. Comparison of IgA-class reticulin and endomysium antibodies in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. Gut; 1989, 30:1225-1232.
5. Khoshoo V, Bhan MK, Unsworth DJ, Kumar R and Walker-Smith A. Anti-reticulin antibodies: useful adjunct to histopathology in diagnosing celiac disease, especially in developing country. J Pediatric Gastroenterol Nutr; 1988, 7: 864-866.
6. Kapuscinska A, Zalewski T, Chorzelski TP, Sulez J, Beutner EH, Kumar R and Rossi T. Disease specificity and dynamics of changes in IgA class anti-endomysial antibodies in celiac disease. J Pediatric Gastroenterol Nutr; 1987, 6: 529-534.
7. Rossi TM, Kumar V, Lerner A et al. Relationship of endomysial antibodies to jejunal mucosal pathology: specificity towards both symptomatic and asymptomatic celiacs. J Pediatric Gastroenterol Nutr; 1988, 7: 858-863.
8. Kumar V, Lerner A, Valeski JE et al. Endomysial antibodies in the diagnosis of celiac disease and the effects of gluten on antibody titers. Immun Invest; 1989 18: 533-544.
9. Calabuig M, Torregosa R, Polo P, Tuset L et al. Serological markers and celiac disease: a new diagnostic approach. J Paediatric Gastroenterol Nutr; 1990, 10:435-442.
10. Karpati S, Bürgin-Wolff A, Krieg T, Maurer M et al. Binding to human jejunum of serum IgA antibody from children with coeliac disease. Lancet; 1990, 336: 1335-1338.
11. Kumar V, Hemedinger E, Chorzelski TP et al. Reticulin and endomysial antibodies in bullous disease - comparison of specificity and sensitivity. Arch Dermatol; 1987, 123: 1179-1182.
12. Peters MS and McEvoy MT. IgA antiendomysial antibodies in dermatitis herpetiformis. J Am Acad Dermatol; 1989, 21: 1225-1231.
13. Walker-Smith JA, Quandalini S, Schmitz J et al. Revised criteria for diagnosis of celiac disease. Report of working group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Arch Dis Child; 1990, 65:909-911.
14. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons New York; 1987, 3rd Ed, 3-40.
15. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1993 (HHS Pub. No. {CDC} 93-8395).

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

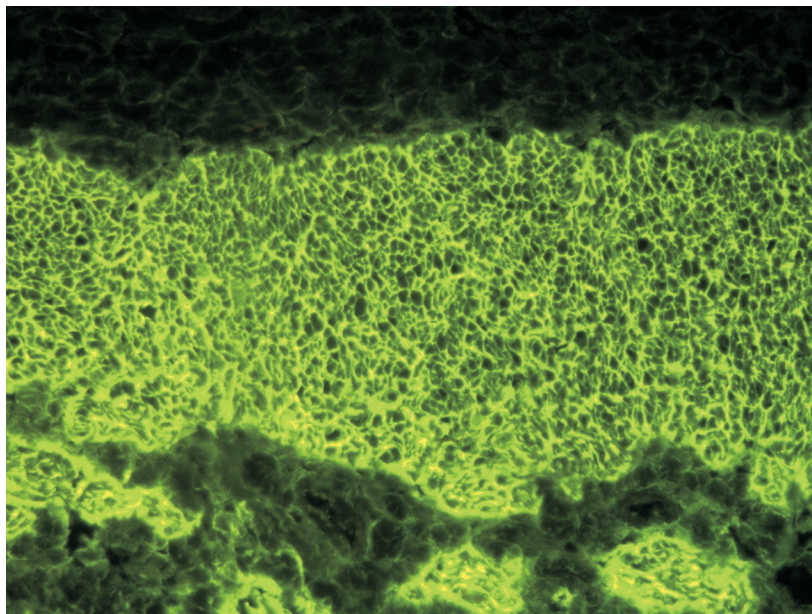


Photo 2. ASMA staining reaction on primate distal esophagus, 200X.
Note staining of the smooth muscle sarcoplasm.

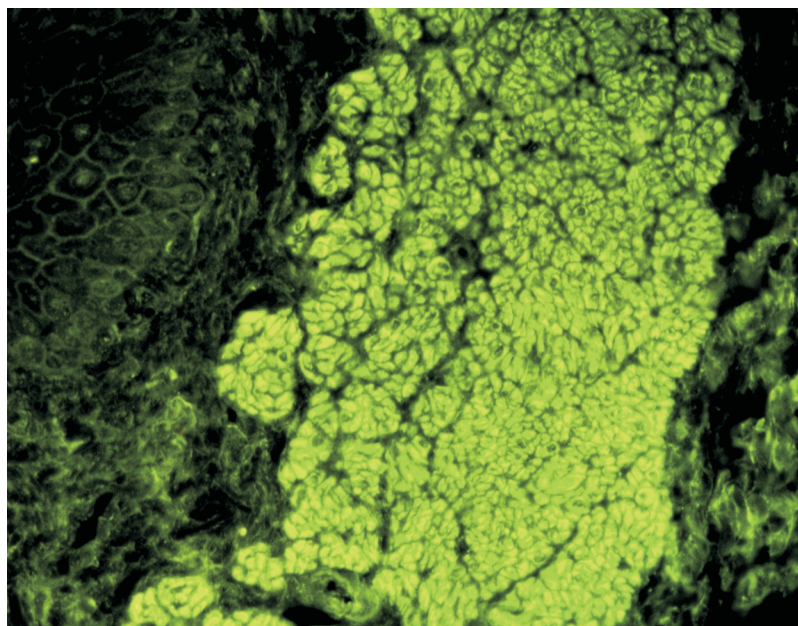
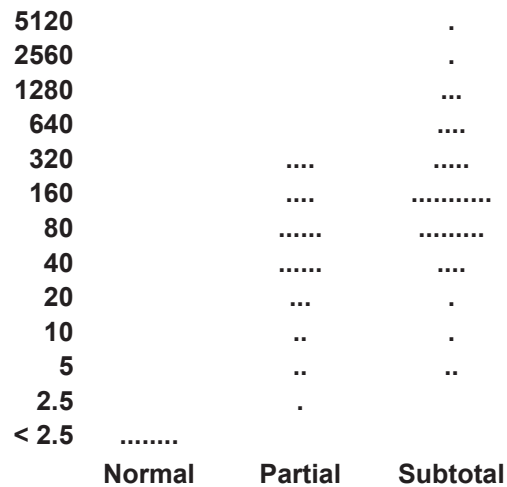




Figure 1: Correlation of IgA-EMA titers in Villous Atrophy



Villous Atrophy
From Chorzelski TP et al¹ and Kumar V et al⁸

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		
Dermatosis	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

UK

UNITED KINGDOM

Distributed by

A. Menarini Diagnostics Ltd
405 Wharfedale Road
Winnersh - Wokingham
Berkshire RG41 5RA

EL

Διανέμεται στην
ΕΛΛΑΔΑ από την

A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argypopolis
Attiki

ES

ESPAÑA

Distribuido por

A. Menarini Diagnosticos
S.A.
Avenida del Maresme, 120
08918 Badalona
Barcelona

DE

DEUTSCHLAND

Vertrieb durch

A. Menarini Diagnostics
Eine Division der Berlin-
Chemie AG
Glienicke Weg 125
12489 Berlin

AT

ÖSTERREICH

Vertrieb durch

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

FR

FRANCE

Distribué par

A. Menarini Diagnostics
France S.A.R.L.
3-5, Rue du Jura
BP 70511
94633 Rungis Cedex

BE

BELGIQUE

Distribué par

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

IT

ITALIA

Distribuito da

A. Menarini Diagnostics
Via lungo l'Ema, 7
50012 Bagno a Ripoli
Firenze

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

EN > Revision date: April 2008

EL > Ημερομηνία αναθεώρησης: Απρίλιος 2008

ES > Fecha de revisión: Abril de 2008

DE > Datum der Überarbeitung: April 2008

FR > Date de révision: Avril 2008

IT > Data di revisione: Aprile 2008

PT > Data de revisão: Abril de 2008

Document No. PI4114A-PDE CE M

