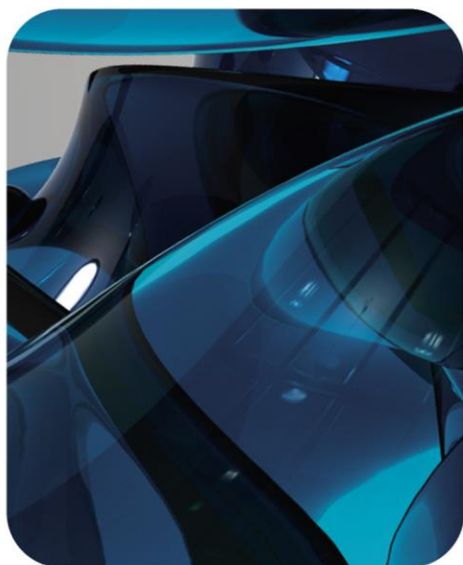




AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

**INSTRUCTION
MANUAL**

FRENCH



AESKUSLIDES®
THE IFA PRODUCT LINE



Manuel d'instructions

ANCA

Réf. standard	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





ANCA

Réf.	Description	Tests	
54.100	ANCA Ethanol (12 puits)	120	Comprend les références de démonstration et en vrac suivantes : xxx.Demo
54.101	ANCA Formalin (12 puits)	120	
54.050	ANCA Ethanol (6 puits)	60	
54.051	ANCA Formalin (6 puits)	60	

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 Wegener¹ 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

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.



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-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.

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.

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 à 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

254 échantillons congelés ont été testés sur AESKUSLIDE ANCA Ethanol et AESKUSLIDES ANCA Formalin et ont été comparés à des réactifs provenant d'une autre société. Les échantillons ont été conservés pendant plusieurs années et représentaient des patients ayant fait l'objet d'une recherche de vascularite. La comparaison des deux kits visait à démontrer une équivalence entre les systèmes ANCA proposés par deux fabricants indépendants, notamment en termes de cohérence des motifs.

Les échantillons cliniques représentaient un spectre complet de maladies auto-immunes.

5.1 Résultats :

ANCA Ethanol	prédicat			
AESKUSLIDES	c	p	nég	Total
c	93		2	95
p		37	2	39
nég	2		118	120
Total	95	37	122	254

concordance positive de	98,5 % ((93+37 / 132))
concordance négative de	96,7 % (118/122)
concordance totale de	97,6 % ((130+118)/254))

ANCA Formalin	prédicat		
AESKUSLIDES	c	nég	Total
c	130	6	136
nég		118	118
Total	130	124	254

concordance positive de	100 % (130 / 130)
concordance négative de	95,1 % (118/124)
concordance totale de	97,6 % ((130+118)/254))

5.2 Reproductibilité et précision

Trois LOTS d'AESKUSLIDES différents pour ANCA Ethanol et ANCA Formalin ont été testés avec 10 échantillons de sérum (4 MPO et PR3 positifs et 2 négatifs) regroupant l'ensemble complet de motifs. Ces échantillons ont été dilués entre 1:40 et 1:5120 et chaque dilution a été analysée par deux lecteurs indépendants sur les trois LOTS. Les critères d'acceptation consistaient en un écart de +/- 1 d'intensité de fluorescence. Les critères d'acceptation ont été remplis pour tous les échantillons, dilutions, LOTS et lecteurs indépendants.

Des données plus précises sont disponibles sur demande.



6. FICHE D'INTERPRÉTATION DES DONNÉES

ANCA

Date:	Lot:	Fixation
Lame n°:	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

7.1 KITS STANDARD

Réf. kit	Description du kit	LAMES (10 par kit)			CONJUGUE (1x)			CONTROLE POSITIF (flacon de 1x 0,5ml dans chaque)	
		Réf.	Puits	Recouvert de	Réf.	Volume	Description	Réf.	Description
54.100	ANCA Ethanol (12 puits)	s54.100	12	neutrophiles humains (fixation par éthanol)	C54.100	4 ml	IgG Bouchon bleu : solution légèrement bleue. Contenu : ASB, Tween, fluorescéine (FITC) étiqueté anticorps anti-humain	PC54.100	ANCA contrôle aspect C-ANCA Bouchon rouge : solution incolore. Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium <0,1 % (conservateur)
								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)	C54.101	4 ml	IgG Bouchon bleu : solution légèrement bleue. Contenu : ASB, Tween, fluorescéine (FITC) étiqueté anticorps anti-humain	PC54.100	ANCA contrôle aspect C-ANCA Bouchon rouge : solution incolore. Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium <0,1 % (conservateur)
								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)	C54.050	2 ml	IgG Bouchon bleu : solution légèrement bleue. Contenu : ASB, Tween, fluorescéine (FITC) étiqueté anticorps anti-humain	PC54.100	ANCA contrôle aspect C-ANCA Bouchon rouge : solution incolore. Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium <0,1 % (conservateur)
								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)	C54.051	2 ml	IgG Bouchon bleu : solution légèrement bleue. Contenu : ASB, Tween, fluorescéine (FITC) étiqueté anticorps anti-humain	PC54.100	ANCA contrôle aspect C-ANCA Bouchon rouge : solution incolore. Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium <0,1 % (conservateur)
								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.

7.2 KITS DE DÉMONSTRATION

Pour le contenu de la démo kits reportez-vous au certificat d'analyse correspondant.



8. RÉACTIFS COMMUNS

a. Réactifs communs

Réf.	Réactif	Quantité / Volume		Description	Prêt à l'emploi
NCANCA	Contrôle négatif	1x	0.5ml	Capuchon vert : solution incolore. Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium < 0,1 % (conservateur)	OUI
* EBIFA	Bleu d'Evans 0,2 %	1x	1.5ml	Capuchon blanc : 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	8ml	Validé pour une utilisation avec HELMED® Capuchon blanc : solution incolore Contenu : PBS, glycérine.	OUI
WBIFA	Tampon de Lavage (10x)	1x	100ml	Capuchon blanc : 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 sodium (conservateur).	NON
SBIFA	Tampon de Echantillons (1x)	1x	70ml	Capuchon blanc : solution incolore pour la dilution des sérums de patients Contenu : BSA, PBS, azoture 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 (24x60 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 / 35-46 °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 / 35-46 °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 / 35-46 °F. **Les réactifs et les lames doivent être utilisés avant la date de péremption indiquée sur chaque composant.**

10. Précautions d'emploi

a. 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 classés 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.

b. 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.
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 ($<1000 \times g$). 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 48 heures bien fermés à une température comprise entre 2 et 8°C / 35 et 46°F ou congelés à -20 °C / -4 °F pour les périodes plus longues. Éviter les congélations et décongélations répétées.

12. Procédure du test

a. Préparation

Amener tous les composants à température ambiante (20-26°C) 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.



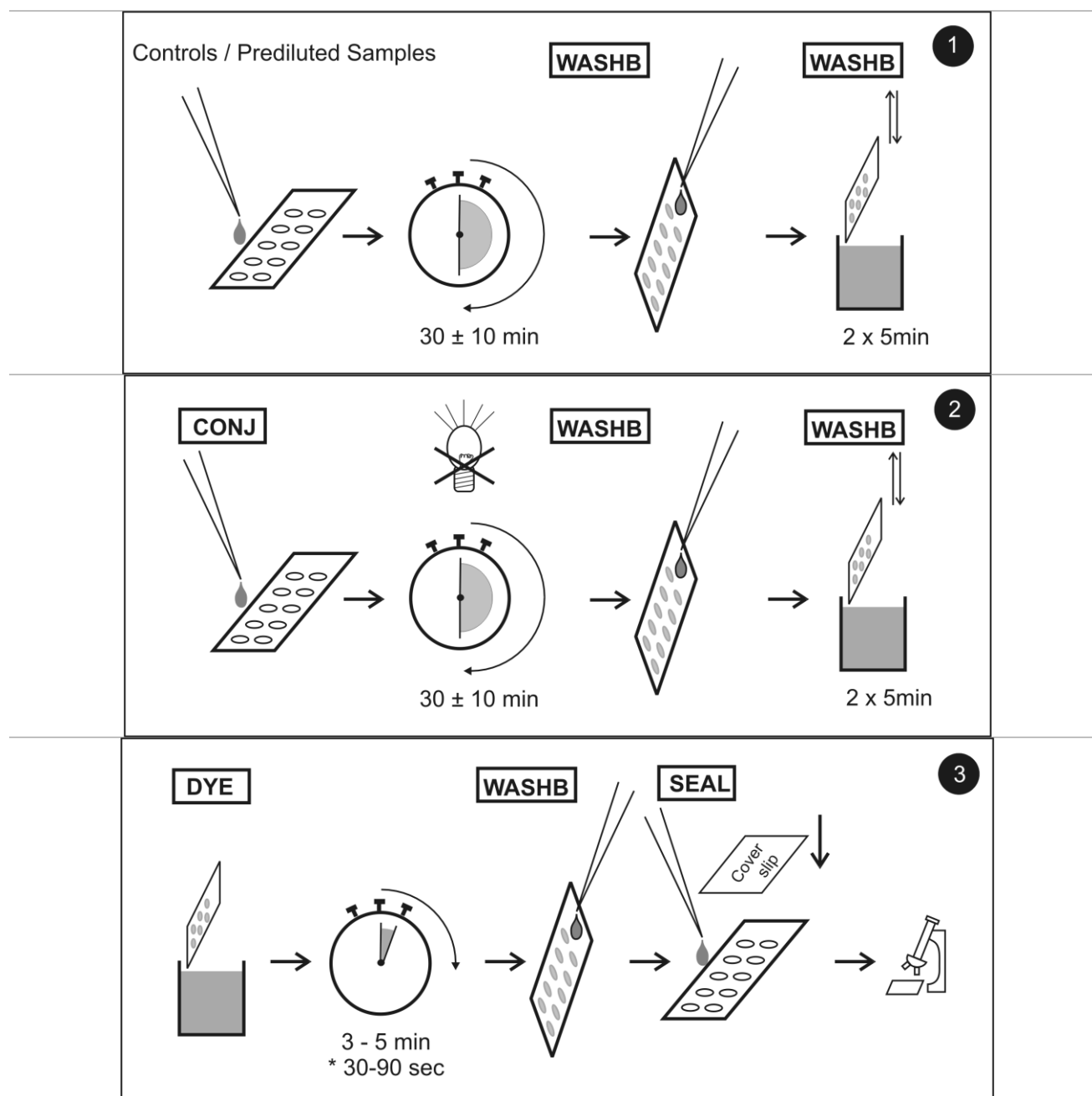
b. Réalisation du test

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'éléments 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 ne 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).

c. Procédure





13. DÉPANNAGE

ERREUR	CAUSES POSSIBLES	SOLUTION
Faible densité des cellules	Lyse des cellules due au contact avec de l'eau déionisée	Respecter les conditions de lavage recommandées
	Tampon éclaboussé directement sur les cellules	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 de papier
	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/35-46°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



IVD	- Diagnosi in vitro - Pour diagnostic in vitro - In Vitro Diagnostikum - Para uso Diagnóstico in vitro	- For in vitro diagnostic use - Para uso diagnóstico in vitro - In Vitro Διαγνωστικό μέσο
REF	~ Numero d'ordine ~ Référence Catalogue ~ Bestellnummer ~ Número de catálogo	~ Catalogue number ~ Numéro de catálogo ~ Αριθμός παραγγελίας
LOT	~ Descrizione lotto ~ Lot ~ Chargen Bezeichnung ~ Lote	~ Lot ~ Lote ~ Χαρακτηρισμός παρτίδας
CE	~ Conformità europea ~ Déclaration CE de Conformité ~ Europäische Konformität ~ Declaração CE de Conformidade	~ EC Declaration of Conformity ~ Declaración CE de Conformidad ~ Ευρωπαϊκή συμφωνία
	~ Rispettare le istruzioni per l'uso ~ Voir les instructions d'utilisation ~ Gebrauchsanweisung beachten ~ Ver as instruções de uso	~ See instructions for use ~ Ver las instrucciones de uso ~ Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	~ Da utilizzarsi entro ~ Utiliser avant le ~ Verwendbar bis ~ Utilizar antes de	~ Use by ~ Utilizar antes de ~ Χρήση μέχρι
	~ Conservare a 2-8°C ~ Conserver à 2-8°C ~ Lagerung bei 2-8°C ~ Conservar entre 2-8°C	~ Store at 2-8°C (35-46°F) ~ Conservar a 2-8°C ~ Φυλάσσεται στους 2-8°C
	~ Prodotto da ~ Fabriqué par ~ Hergestellt von ~ Fabricado por	~ Manufactured by ~ Fabricado por ~ Κατασκευάζεται από
DYE	~ Colorante Blue-Evans ~ coloration au Bleu Evans ~ Evans-Blue Färbelösung ~ Evans Blue	~ Evans-Blue Dye ~ Colorante Azul de Evans ~ Evans Blue
CONTROL +	~ Controllo positivo ~ Contrôle Positif ~ Positiv Kontrolle ~ Controllo positivo	~ Positive Control ~ Control Positivo ~ Θετικός ορός ελέγχου
CONTROL -	~ Controllo negativo ~ Contrôle Négatif ~ Negativ Kontrolle ~ Controllo negativo	~ Negative Control ~ Control Negativo ~ Αρνητικός ορός ελέγχου
SEAL	~ Mezzi di montaggio ~ milieu de montage ~ Mounting Medium ~ Meio de montagem	~ Mounting media ~ Medio de montaje ~ Μέσο μονιμοποίησης
CONJ	~ Coniugato ~ Conjugué ~ Konjugat ~ Conjugado	~ Conjugate ~ Conjugado ~ Σύζευγμα
	~ Vetrino per microscopio ~ lame de microscope ~ Objekträger ~ Lâmina	~ Microscope slide ~ Portaobjetos ~ Αντικειμενοφόρο πλακίδιο
WASHB 10x	~ Tampone di lavaggio ~ Tampon de Lavage ~ Waschpuffer ~ Solución de lavado	~ Wash Buffer ~ Solução de lavagem ~ Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
SB 1x	~ Tampone di campione ~ Tampon de Echantillons ~ Probenpuffer ~ Solución de Muestras	~ Sample Buffer ~ Solução de Muestras ~ Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	~ XX determinazioni ~ XX tests ~ XX Bestimmungen ~ XX Testes	~ XX tests ~ XX pruebas ~ XX προσδιορισμοί