









# Anti-Facteur intrinsèque MODE D'EMPLOI

96 déterminations

**REF** 3600



Test immunoenzymatique (ELISA) pour le dosage des auto-anticorps anti-facteur intrinsèque dans le sérum humain.

<b>REF</b>	N° de catalogue	<b>LOT</b>	N° de lot
	Se référer aux documents		Fabriqué par
	A stocker à		Date de péremption
	Consulter le mode d'emploi		Risque biologique

## INTRODUCTION

La trousse anti-facteur intrinsèque est destinée au dosage semi-quantitatif des anticorps anti-facteur intrinsèque IgG dans le sérum humain.

La maladie de Biermer de l'adulte (ou anémie pernicieuse acquise) est la pathologie la plus fréquemment associée à une carence en vitamine B12. Elle se développe de façon insidieuse et entraîne dans sa première phase une anémie mégalo-blastique avec un volume corpusculaire moyen réduit et une hypersegmentation des polynucléaires neutrophiles. Non traitée, la maladie de Biermer peut évoluer vers des expressions cliniques neurologiques ou psychiatriques.

La maladie de Biermer, d'origine auto-immune, touche préférentiellement des sujets de race blanche au teint clair au-delà de 40 ans. En Europe, sa fréquence est estimée à 0,12%. Toutefois, elle est nettement plus répandue chez les jeunes femmes de race noire et chez les Latino-Américains. Des associations avec des affections thyroïdiennes auto-immunes ou avec un diabète insulino-dépendant ne sont pas rares.

La maladie de Biermer est caractérisée par une gastrite atrophique du fundus qui touche essentiellement les cellules pariétales. La lésion fundique entraîne progressivement l'anachlorydrie et une hypergastrinémie. L'infiltration lymphocytaire de la muqueuse provoque l'apparition l'anticorps anti-cellules pariétales gastriques et d'anticorps anti-facteur intrinsèque.

Le rôle pathologique des anticorps anti-cellules pariétales n'est pas complètement élucidé mais il est probable que ces anticorps soient directement impliqués dans l'élévation du pH gastrique classiquement observée dans l'anémie pernicieuse. Les anticorps anti-facteur intrinsèques inhibent la résorption de la cobalamine par la muqueuse intestinale. Dès 1964, il a été démontré que deux types d'anticorps peuvent être présents dans l'estomac.

- Les anticorps de type I ou anticorps bloquants se fixent au site de liaison de la cobalamine au facteur intrinsèque. Ils sont également capables de libérer la vitamine du complexe cobalamine – facteur intrinsèque mais ne se fixent qu'à un pH élevé.
- Les anticorps de type II ou anticorps liants bloquent un autre site antigénique de la molécule de facteur intrinsèque à ses récepteurs iléaux. Ces anticorps lient indifféremment le facteur intrinsèque et les complexes facteur intrinsèque-vitamine B12.

Les anticorps de type I et II présents dans le suc gastrique sont essentiellement des IgG mais des IgA ont également été décelées.

Les anticorps sériques reflètent le profil immunologique du suc gastrique; toutefois, les IgG dominant pour les anticorps de type I alors que les anticorps de type II sont présents simultanément sous forme d'IgG et d'IgM.

Les anticorps anti-facteur intrinsèque sériques constituent un marqueur extrêmement spécifique de la maladie de Biermer: aucun résultat positif n'a pu être confirmé à ce jour dans la population normale. Les quelques rares cas de faux positifs trouvés dans d'autres formes de gastrite atrophique restent discutables et peuvent être dus à des formes latentes de la maladie de Biermer. Cette spécificité remarquable est à opposer au peu de valeur diagnostique du taux d'anticorps anti-cellules pariétales.

Toutefois, selon la littérature, les anticorps anti-facteur intrinsèque ne sont présents que chez la moitié des patients atteints d'une maladie de Biermer. Il faut cependant noter que pendant des années, il n'a été possible de détecter que les anticorps de type I par des RIA. A cette époque, on considérait que la plupart des échantillons contenaient les deux types d'anticorps. Des études récentes ont battu en brèche ce concept et il semble qu'un ELISA capable de détecter simultanément les deux types d'anticorps soit à même d'augmenter la sensibilité du dosage. En outre, la méthode ELISA n'est pas affectée par les protéines de transport et l'administration de vitamine B12, lors d'un test de Schilling par exemple, n'influence pas les résultats. Elle constitue donc un outil d'investigation de choix pour le diagnostic différentiel de l'anémie de Biermer.

## PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse anti-facteur intrinsèque est un dosage immuno-enzymatique pour la détermination semi-quantitative des IgG contre le facteur intrinsèque.

Les anticorps présents dans les contrôles et les échantillons dilués réagissent avec du facteur intrinsèque immobilisé sur des microcupules en polystyrène. L'utilisation de facteur intrinsèque humain recombinant garantit la spécificité du dosage.

Au cours d'une première incubation de 60 minutes à température ambiante, les anticorps anti-facteur intrinsèque, s'ils sont présents, se fixent spécifiquement aux cupules.

Après lavage, un anticorps anti-IgG humaines conjugué à la peroxydase de raifort se lie aux immunoglobulines précédemment retenues sur la phase solide.

Au terme d'une seconde incubation de 30 minutes à température ambiante, l'excès de conjugué est éliminé par lavage, puis la présence de l'enzyme est révélée par un substrat chromogène (TMB). La densité optique de l'échantillon est déterminée par lecture à 450 nm sur un lecteur de microplaques après addition d'une solution d'arrêt et est directement proportionnelle à la concentration en anticorps anti-facteur intrinsèque.

## ECHANTILLONS DES PATIENTS

### **Prélèvement et conservation des échantillons**

Le sang est prélevé par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum est récupéré par centrifugation. Il peut être conservé à 2-8°C pour un maximum de 3 jours. Au-delà de cette durée, conserver à -20°C.

Eviter les congélations/décongélations répétées. Dans le cas d'utilisations multiples, aliquoter les échantillons et les stocker à -20 °C.

### **Préparation avant utilisation**

Mélanger soigneusement les échantillons de sérum pour obtenir une certaine homogénéité.

**Note :** Les échantillons doivent être dilués au 1/101 (v/v) avant de débiter le dosage, soit 10 µl d'échantillon + 1 ml de diluant (C).

## Composition du kit pour 96 déterminations

A <b>96</b>	<b>Microplaque 96 puits</b> : 12 barrettes sécables de 8 puits revêtus de facteur intrinsèque recombinant humain	1 plaque scellée sous vide avec dessiccateur
B <b>BUFWASH</b>	<b>Tampon de lavage concentré</b> pour 1000 ml de solution <b>10X</b>	1 flacon de 100 ml de solution concentrée, bouchon blanc
C <b>DIL</b>	<b>Diluant des échantillons</b>	1 flacon de 100 ml prêt à l'emploi, bouchon noir
D <b>CONJ</b>	<b>Conjugué</b> : solution d'anti-IgG humaine de mouton couplé à la peroxidase de raifort	1 flacon de 15 ml prêt à l'emploi, bouchon rouge
E <b>SOLN TMB</b>	<b>Substrat</b> : 3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine en tampon citrate avec de l'eau oxygénée	1 flacon de 15 ml prêt à l'emploi, bouchon bleu
F <b>H2SO4</b>	<b>Solution d'arrêt</b> : acide sulfurique 0,25M <b>0,25 M</b>	1 flacon de 15 ml prêt à l'emploi, bouchon jaune
P <b>CONTROL</b>	<b>Contrôle positif</b> : sérum humain dilué <b>+</b>	1 flacon de 1,0 ml prêt à l'emploi, bouchon rouge
CO <b>CONTROL</b>	<b>Contrôle seuil</b> : sérum humain dilué <b>C</b>	1 flacon de 1,0 ml prêt à l'emploi, bouchon blanc
N <b>CONTROL</b>	<b>Contrôle négatif</b> : sérum humain dilué <b>-</b>	1 flacon de 1,0 ml prêt à l'emploi, bouchon vert

### Matériel non fourni

- micropipette 100 - 1000 µl
- micropipette 10 - 100 µl
- pipette multicanaux 50 – 200 µl et réservoir
- peigne de lavage à 8 canaux avec pompe à vide ou laveur de microplaques
- lecteur de microplaque avec filtres optiques 450 nm, 620 nm ou 690 nm
- eau distillée ou déionisée
- cylindre gradué

### Format et conservation

La trousse anti-facteur intrinsèque a été conçue pour 96 déterminations.

La date de validité de chaque réactif est indiquée sur l'étiquette correspondante et rapportée sur l'étiquette du coffret.

A réception du coffret, tous les composants de la trousse doivent être conservés à 2 – 8 °C, de préférence dans l'emballage d'origine.

Après ouverture du coffret, tous les composants sont stables pour un minimum de 2 mois dans les conditions de conservation prescrites.

### **Préparation avant l'emploi**

Porter tous les composants du coffret à température du laboratoire avant utilisation pour le dosage.

La plaque de microtitration est scellée sous vide avec un dessicant. La plaque est composée d'un cadre et de barrettes de cupules sécables. Porter la plaque à température ambiante avant d'ouvrir son emballage. Les cupules inutilisées doivent être conservées à 2-8°C et replacées dans l'emballage d'origine pour les protéger de l'humidité.

Préparer une quantité suffisante de solution de lavage en diluant le tampon concentré 10x (1+9) avec de l'eau déionisée ou de l'eau distillée. La solution de lavage diluée est stable à 2-8°C pendant 30 jours. Veiller à ce que le temps de contact de la solution de lavage dans les cupules soit d'au moins 5 secondes par cycle de lavage.

Eviter d'exposer le substrat à la lumière.

## PROTOCOLE DE DOSAGE

- **Diluer les sérums des patients avec le diluant des échantillons (C) au 1/101 (v/v) ; exemple 10 µl + 1,0 ml de diluant des échantillons (C).**
  - **Une fois l'analyse commencée, toutes les étapes doivent être menées à leur terme sans interruption, en respectant les temps d'incubation prescrits.**
1. Porter tous les réactifs à température ambiante (20 à 25°C) et mélanger doucement en évitant la formation de mousse.
  2. Pipeter
    - 100 µl de contrôles (P, CO et N)
    - 100 µl des échantillons sériques dilués des patients
  3. Sceller la plaque et incuber 60 minutes à température du laboratoire.
  4. Décantier. Laver chaque cupule **3 fois** avec 300 µl de solution de lavage (préparée à partir de **B**).
  5. Ajouter 100 µl de conjugué (**D**) à chaque cupule.
  6. Sceller la plaque et incuber 30 minutes à température ambiante.

7. Décanner. Laver chaque cupule **3 fois** avec 300 µl de solution de lavage (préparée à partir de **B**).
8. Ajouter 100 µl de substrat (**E**) à chaque cupule.
9. Incuber 15 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante.
10. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (**F**) à chaque cupule et mélanger doucement.
11. Lire les densités optiques à 450 nm dans les 15 minutes suivant l'étape 10.

## CALCUL DES RÉSULTATS

Calculer l'indice de liaison IL en utilisant la densité optique du calibrateur seuil. L'indice de liaison est obtenu en divisant la densité optique de l'échantillon par la densité optique du calibrateur seuil.

**IL = DO échantillon / DO calibrateur seuil**

## Exemple de résultats

**A ne pas utiliser lors des tests !**

Puits	DO1	DO2	DO Moyenne	IL
Contrôle positif	1,483	1,451	1,467	
Contrôle seuil	0,162	0,157	0,160	
Contrôle négatif	0,101	0,099	0,100	
Patient 1	1,218	1,186	1,202	<b>7,5 - Positif</b>
Patient 2	0,108	0,116	0,112	<b>0,7 - Négatif</b>
Patient 3	0,171	0,161	0,166	<b>1,0 - Equivoque</b>

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Afin de valider la manipulation, le contrôle positif doit impérativement avoir une densité optique moyenne supérieure ou égale à 0,6. Le contrôle seuil doit impérativement avoir une densité optique moyenne inférieure ou égale à 0,5. Le contrôle négatif doit impérativement avoir une densité optique moyenne inférieure ou égale à 0,2.

Si ces critères ne sont pas remplis, répéter le dosage en vérifiant que toutes les étapes de la procédure ont été scrupuleusement respectées (temps et températures d'incubation, dilution du tampon de lavage, étapes de lavage...). En cas de nouvel échec, contacter votre fournisseur.

## VALEURS DE REFERENCE

Anti-facteur intrinsèque	IL
Positif	> 1,0
Négatif	≤ 1,0

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs normales et pathologiques. De ce fait, les valeurs ci-dessus sont données uniquement à titre indicatif.

### Limites du test

Les patients sains doivent être négatifs en utilisant le coffret anti-facteur intrinsèque. Toutefois, on peut observer un résultat positif chez certaines personnes apparemment saines. Tout diagnostic ne doit pas être basé sur le seul résultat de la biologie, le médecin devant prendre en compte l'ensemble des aspects cliniques et biologiques.

## DONNEES ANALYTIQUES

### Calibration

Il n'existe aucune préparation de référence pour le dosage des auto-anticorps contre le facteur intrinsèque et les résultats sont exprimés en indice de liaison.

### Sensibilité et spécificité cliniques

Une étude portant sur 45 individus sans signe clinique d'anémie de Biermer et sur 25 patients avec un diagnostic clinique d'anémie de Biermer a fourni les résultats suivants :

- spécificité : 91%
- sensibilité : 98%

### Précision

#### Répétabilité

4 sérums ont été mesurés en 8 réplicats dans un seul dosage

Echantillon n°	DO moyenne	CV (%)
1	1,643	2,70
2	1,031	3,94
3	0,641	5,14
4	0,168	5,41

## Reproductibilité

4 sérums ont été mesurés en triplicats dans 8 dosages distincts

Echantillon n°	DO moyenne	CV (%)
1	1,498	4,58
2	1,001	5,11
3	0,588	4,07
4	0,168	2,93



## PROTOCOLE RESUME

Diluer les échantillons des patients: 10 µl + 1,0 ml de diluant des échantillons (C)

1	Amener tous les réactifs à température ambiante (20 à 25°C)		
		Contrôles	Patient 1 etc.
2	Pipeter Contrôle positif (P) Contrôle seuil (CO) Contrôle négatif (N) Sérum dilué Patient 1 etc.	100 µl	100 µl
3	Incuber	60 minutes à température ambiante 18-25°C	
4	Laver et décanner	3 x 300 µl (à partir de B)	
5	Pipeter le conjugué (D)	100 µl	100 µl
6	Incuber	30 minutes à température ambiante 18-25°C	
7	Laver et décanner	3 x 300 µl (à partir de B)	
8	Pipeter le substrat (E)	100 µl	100 µl
9	Incuber à l'abri de la lumière	15 minutes à température ambiante 18-25°C	
10	Pipeter la solution d'arrêt (F)	100 µl	100 µl
11	Mesurer la DO à 450 nm dans les 30 minutes		

## PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Ce coffret est destiné uniquement à un usage *in vitro*. Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
- Les dates d'expiration sur les différentes étiquettes doivent être respectées, ainsi que les délais de conservation des réactifs après reconstitution.
- Ne pas utiliser ou mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser des réactifs d'autres fabricants.
- Eviter les temps morts durant la distribution des réactifs.

- Tous les réactifs doivent être stockés à 2 – 8 °C dans l’emballage d’origine avant toute utilisation.
- Eviter tout contact de l'acide sulfurique (solution d'arrêt) avec la peau et les muqueuses. En cas d'éclaboussures, laver immédiatement à l'eau.
-  • Certains des réactifs contiennent de faibles quantités de thimérosal (< 0,1%) et de kathon (1% v/v). Ils ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses.
-  • Les produits d’origine humaine ont subi un dépistage négatif vis-à-vis des anticorps anti-VIH, anti-VHC et de l’antigène HBS. Toutefois, aucun test de laboratoire ne peut garantir l’absence de ces agents viraux. Les réactifs comme les échantillons doivent donc être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.

Distribution en France :

**LABODIA**

LABODIA France  
266 avenue Daumesnil  
75012 PARIS

 N° Vert 0800 114 700

Fax : 03.21.49.59.56

E-mail : [info@labodia.com](mailto:info@labodia.com)

Website : [www.labodia.com](http://www.labodia.com)