

# Mode d'emploi HepAK 7 Plus Dot (#4099)

24 x 7 déterminations







(Rév. 01/04/2009)



IVD

Utilisation pour le diagnostic in vitro

Immunodot pour la détection des anticorps IgG anti-M2, anti-gp120, anti-sp100, anti-LKM1, anti-LC1, anti-SLA et anti-F-actine dans le sérum ou le plasma 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 HepAK 7 Plus Dot est destinée à la détermination qualitative des anticorps IgG anti-M2, anti-gp120, anti-sp100, anti-LKM1, anti-LC1, anti-SLA et anti-F-actine dans le sérum ou le plasma humain en vue du diagnostic différentiel des hépatopathies auto-immunes. Le groupe des hépatopathies auto-immunes primaires comprend l'hépatite auto-immune, la cirrhose biliaire primitive (CBP) et la cholangite sclérosante primitive (CSP).

Le tableau clinique des hépatopathies primaires auto-immunes ne diffère que rarement de celui des autres maladies chroniques du foie. L'étiologie auto-immune est présente dans environ 15% de l'ensemble des cas des maladies chroniques du foie (1). Après exclusion d'une origine infectieuse, en particulier virale, il est donc recommandé de rechercher les différents auto-anticorps associés aux atteintes hépatiques auto-immunes.

Les patients atteints de CSP présentent également des symptômes intestinaux et un aspect ANCA atypique en immunofluorescence sur neutrophiles.

La CBP est caractérisée par la présence d'anticorps anti-mitochondriaux. Les anticorps anti-M2 réagissent avec des épitopes de la sous-unité E2 du complexe multi-enzymatique de la pyruvate-déshydrogénase et avec des épitopes d'autres complexes de déshydrogénases impliquées dans le métabolisme des acides cétoniques.

La CBP est également associée à la présence d'auto-anticorps anti-nucléaires réagissant avec la protéine des pores nucléaires gp210 et avec la protéine sp100 (2). Des données récentes indiquent que ces anticorps nucléaires sont associés avec différentes évolutions de la CPB. C'est ainsi que la présence d'anti-gp210 est de très mauvais pronostic (3). Dans une étude très récente (4), la présence d'anti-gp120 ou d'anti-sp100 était associée à un pourcentage important de décès ou de

transplantation hépatique chez des patients présentant des réponses variables au traitement à l'acide ursodésoxycholique.

Les patients souffrant d'hépatite auto-immune présentent une grande variété d'auto-anticorps, ce qui a permis de distinguer 3 grands types d'hépatites auto-immunes.

L'hépatite de type 1 est caractérisée par la présence d'anticorps anti-nucléaires et d'anticorps contre les muscles lisses (ASMA). Ces derniers reconnaissent la structure antigénique de l'actine filamenteuse (F-actine).

Dans l'hépatite de type 2, on trouve surtout des anticorps dirigés contre le réticulum endoplasmique (anti-liver kidney microsome : anti-LKM). Les anti-LKM1 reconnaissent des épitopes du cytochrome P450 2D6. Celui-ci métabolise plus de 25 médicaments connus dont les bêta-bloquants et les anti-arythmiques. Les anti-cytosol de type 1 (LC1) sont également spécifiques de l'hépatite de type 2. Leur cible est une enzyme du cytosol des cellules hépatiques : la formiminotransférase cyclodésaminase (FTCD).

Dans l'hépatite de type 3, les patients présentent essentiellement des anti-SLA (soluble liver antigen). Toutefois, cette notion d'hépatite de type 3 est contestée par certains auteurs (5).

(1) Czaja AL. Natural history, clinical features and treatment of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* (1987) 4: 1 - 12

(2) Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. *World J. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. Gastroenterol.* 2008 Jun 7;14 (21):3374-87.

(3) Nakamura M et al. Specificity and Sensitivity of gp210 Autoantibodies detected using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and a Synthetic Polypeptide in the Diagnosis of Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatology* 1996; 23(5): 1020-1024.

(4) Corpechot C et al. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2008 Sep;48(3):871-7. [Links](#)

(5) Johnson PJ, McFarlane IA. Meeting Report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* (1993) 18: 998 - 1005

## Principe

HepAK 7 Plus Dot est un immunodot sensible pour la mise en évidence d'anticorps de classe IgG anti-M2, anti-gp120, anti-sp100, anti-LKM1, anti-LC1, anti-SLA et anti-F-actine dans le sérum ou le plasma humain. La trousse contient 24 bandelettes numérotées, chaque bandelette comportant 9 spots fixés sur un support plastique. 2 spots servent de contrôles positif et négatif.

Lors de la première incubation, les auto-anticorps présents dans les échantillons se lient aux antigènes cibles immobilisés sur les spots. Au terme de 30 minutes d'incubation à température ambiante sous agitation, les composants de l'échantillon qui ne se sont pas liés à la bandelette sont éliminés par lavage. Dans une seconde incubation de 30 minutes, les anticorps du patient réagissent avec un conjugué anti-IgG marqué à la phosphatase alcaline. L'excès de conjugué est éliminé par lavage.

La phosphatase alcaline convertit le substrat incolore en un précipité violet foncé. Après 10 minutes sous agitation, la réaction est arrêtée par une dernière étape de lavage.

Les bandelettes sont séchées pendant au moins 30 minutes en pressant le côté réactionnel sur du papier absorbant. Un résultat est considéré comme positif si la coloration du spot est plus intense que la coloration du contrôle négatif.

## Préparation des échantillons

### Collecte et récolte des échantillons

Prélever le sang par ponction veineuse. Récolter le sérum par centrifugation après coagulation. Le plasma peut également être utilisé dans ce test.

Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2 et +8°C pendant 3 jours maximum, sinon congelés à -20°C.

Eviter les cycles congélation/décongélation.

### Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être dosés à température ambiante. Les mélanger par inversion avant le dosage.

## Réactifs fournis

<p>A</p> <p><b>Ag</b></p>	<p><b>Bandelettes</b> : 24 bandelettes numérotées avec 9 spots :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- contrôle positif</li> <li>- contrôle négatif</li> <li>- M2 (enzyme mitochondrio-membranaire, recombinant humain, PDC-E2, OGDC-E2 et BCOADC-E2)</li> <li>- gp210 (glycoprotéine 210 des pores nucléaires membranaires, recombinante humaine)</li> <li>- sp100 (protéine des corps nucléaires, recombinante humaine)</li> <li>- LKM1 (cytochrome P450 2D6, tripeptide AA 193-218, AA 261-287 et AA 321-351, recombinant humain)</li> <li>- LC1 (formiminotransférase cyclodésaminase, recombinante humaine)</li> <li>- SLA (souris)</li> <li>- F-actine (lapin)</li> </ul>	<p>24 bandelettes</p>
<p>B</p> <p><b>BUFWASH</b></p>	<p><b>Tampon de lavage concentré</b> pour 400 ml de solution</p> <p><b>10X</b></p>	<p>1 flacon de 40 ml de solution concentrée, bouchon bleu</p>
<p>C</p> <p><b>DIL</b></p>	<p><b>Diluant des échantillons</b> (coloré en jaune)</p>	<p>1 flacon de 40 ml prêt à l'emploi, bouchon jaune</p>
<p>D</p> <p><b>CONJ</b></p>	<p><b>Conjugué</b> : solution d'anti-IgG humaine de chèvre couplé à la phosphatase alcaline (coloré en rouge)</p>	<p>1 flacon de 40 ml prêt à l'emploi, bouchon rouge</p>
<p>E</p> <p><b>SOLN NBT/BCIP</b></p>	<p><b>Substrat</b> : nitro-bleu de tétrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</p>	<p>1 flacon de 40 ml prêt à l'emploi, bouchon noir</p>
<p>F</p>	<p><b>Plateau d'incubation à 8 canaux</b></p>	<p>3 plateaux</p>

## Matériel supplémentaire

- micropipette 100-1000µl
- micropipette 10-100µl
- pointes
- **agitateur à balancier ou rotatif**
- cylindres gradués
- eau distillée et eau déminéralisée
- pincettes en plastique
- papier absorbant

## Stockage

Cette trousse permet l'analyse de 24 échantillons. La date d'expiration de chaque composant de la trousse figure sur son étiquette et la date d'expiration de la trousse sur l'étiquette du coffret. Dès réception, conserver tous les composants de la trousse à 2- 8 °C, de préférence dans leur emballage d'origine. Après ouverture de la trousse, tous les composants sont stables au minimum 2 mois.

## Préparation du dosage

Amener tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.

Diluer 1/10 le tampon (réactif B) avec de l'eau distillée ou déminéralisée.

Pour chaque bandelette à tester, il faut 15 ml de tampon dilué.  
Exemple : 10 ml de tampon concentré + 90 ml d'eau distillée.

Après dilution, le tampon est stable à 2- 8 °C pendant 1 mois. Tous les autres composants sont prêts à l'emploi et stables jusqu'à la date d'expiration.

Eviter d'exposer le substrat à la lumière.

## Mode opératoire

- **Respecter strictement les instructions et éviter tout décalage dans les temps d'incubation**
  - **Tout le dosage doit se dérouler sur un agitateur à balancier**
- 1- Sortir les réactifs de la trousse et prélever le nombre requis de bandelettes. Mélanger les réactifs par inversion.
  - 2- Pipeter **2 ml** de tampon dilué (préparé à partir du tampon B) dans chaque canal du plateau. Puis, à l'aide de la pincette, placer chaque bandelette dans le canal, **côté réactionnel tourné vers le haut. Il est important de mettre le tampon avant la bandelette, et ensuite de vérifier que celle-ci est bien immergée. Éviter la formation de bulles d'air à la surface de la bandelette côté réactionnel.**
  - 3- Couvrir et incuber 10 minutes à température ambiante 18-25°C sous agitation.
  - 4- Décanter (Attention : Laisser écouler le liquide d'incubation en inclinant le plateau d'incubation. Eliminer le liquide restant avec du papier absorbant).
  - 5- Ajouter 1,5 ml de diluant des échantillons (C) et 10 µl d'échantillon de patients.
  - 6- Couvrir et incuber 30 minutes à température ambiante 18-25°C sous agitation.
  - 7- Décanter (Attention : Laisser écouler le liquide d'incubation en inclinant le plateau d'incubation. Eliminer le liquide restant avec du papier absorbant). Distribuer **1,5 ml de tampon dilué**. Incuber **3 minutes sous agitation**. Décanter et répéter l'opération 2 fois 3 minutes sous agitation pour un total de **3 lavages**.
  - 8- Pipeter **1,5 ml** de conjugué (D) à **température ambiante** dans chaque canal
  - 9- Couvrir et incuber 30 minutes à température ambiante (18-25°C) sous agitation

- 10- Décanter (Attention : Laisser écouler le liquide d'incubation en inclinant le plateau d'incubation. Eliminer le liquide restant avec du papier absorbant). Distribuer **1,5 ml de tampon dilué**. Incuber **3 minutes sous agitation**. Décanter et répéter l'opération 2 fois 3 minutes sous agitation pour un total de **3 lavages**.
- 11- Pipeter **1,5 ml** de substrat (E) à **température ambiante** dans chaque canal
- 12- Couvrir et incuber 10 - 12 minutes à température ambiante (18-25°C) sous agitation
- 13- Décanter et laver 1 fois avec 1,5 ml de tampon dilué (à partir de B) à **TEMPERATURE AMBIANTE** pour stopper la réaction du substrat. (Attention : Laisser écouler le liquide d'incubation en inclinant le plateau d'incubation. Eliminer le liquide restant avec du papier absorbant).
- 14- Saisir les bandelettes par leur extrémité numérotée à l'aide d'une pincette et les déposer sur du papier absorbant face réactionnelle contre le papier. Les presser brièvement. Au bout de 30 minutes, procéder à la lecture.

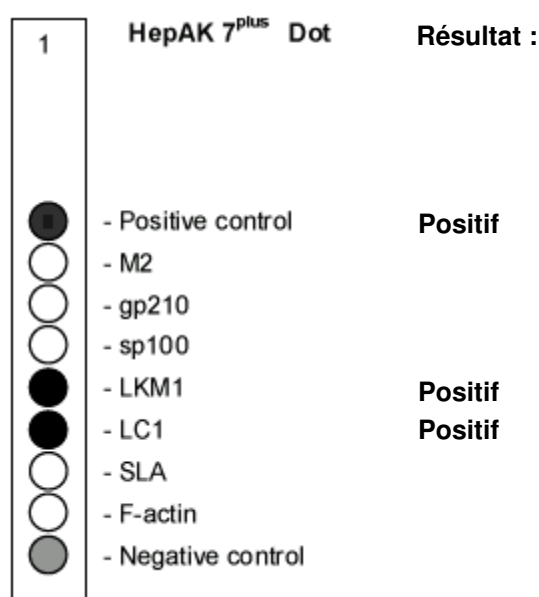
## Lecture des résultats

Les bandelettes ne peuvent être interprétées qu'après séchage complet pendant au moins 30 minutes.

Le **contrôle positif** doit être visible sur chaque bandelette. Sa coloration garantit que le test a été effectué correctement et que les réactifs n'ont subi aucune dégradation. Si le spot du contrôle positif n'est pas coloré, les résultats ne peuvent pas être interprétés.

Le **contrôle négatif** reflète l'intensité du bruit de fond de l'échantillon. La coloration de ce spot correspond à l'intensité minimale au-delà de laquelle un échantillon est considéré comme positif.

Les spots revêtus d'auto-antigènes détectent la présence d'auto-anticorps spécifiques dans les échantillons. L'intensité de ces spots dépend du titre d'auto-anticorps contenu dans l'échantillon. Un échantillon est considéré comme positif pour un type d'auto-anticorps si la coloration du spot correspondant est plus intense que celle du contrôle négatif.



### **Résultat positif**

Un échantillon est considéré comme positif pour la présence d'auto-anticorps anti-M2, anti-gp120, anti-sp100, anti-LKM1, anti-LC1, anti-SLA ou anti-F-actine si la coloration de ces spots est plus intense que la coloration du contrôle négatif.

A noter que l'intensité de la coloration du contrôle négatif dépend des conditions expérimentales (temps et température d'incubation, efficacité des lavages) et de la composition de chaque échantillon. Ce spot peut être totalement incolore alors que le test a été effectué dans de bonnes conditions.

### **Résultat négatif**

Un échantillon est considéré comme négatif pour la présence d'auto-anticorps anti-M2, anti-gp120, anti-sp100, anti-LKM1, anti-LC1, anti-SLA ou anti-F-actine si la coloration de ces spots est moins intense que la coloration du contrôle négatif.

## **Limites d'utilisation**

Les individus sains devraient fournir des résultats négatifs dans ce test. Toutefois, on peut rencontrer des anti-M2, anti-gp120, anti-sp100, anti-LKM1, anti-LC1, anti-SLA ou anti-F-actine chez des personnes apparemment saines. Les résultats de ce test doivent être interprétés par un médecin en tenant compte de l'ensemble du tableau clinique et biologique.

## **Données analytiques**

### **Spécificité et sensibilité cliniques**

La sensibilité du test a été évaluée en testant des populations cliniquement et biologiquement définies (en utilisant des tests biologiques de référence). La spécificité a été évaluée en testant des groupes de contrôle cliniquement définis (population normale) et groupes de patients atteints de diverses pathologies auto-immunes.

Sensibilité :

anti-M2, anti-gp120, anti-sp100, anti-LKM1, anti-LC1, anti-SLA ou anti-F-actine : >99%

Spécificité :

anti-M2, anti-gp120, anti-sp100, anti-LKM1, anti-LC1, anti-SLA ou anti-F-actine : >99%

### **Comparaison avec des méthodes de référence**

L'étude clinique de la trousse a été organisée en collaboration avec le Pr René Louis Humbel du Laboratoire d'Immunopathologie du Centre hospitalier du Luxembourg.

**Sérums négatifs (n=20) :** sérums d'individus asymptomatiques négatifs pour chacun des auto-anticorps testés en ELISA, IFI, Western Blot et immunodiffusion.

**Sérums positifs en anti-M2 (n=15) :** positifs en IFI sur des coupes de triple substrat (foie, rein, estomac de rat) et sur cellules Hep-2, ainsi qu'en ELISA (anti-PDH ELISA du Centre hospitalier du Luxembourg).

		ELISA		IFI	
		+	-	+	-
DOT GA	+	15	0	15	0
	-	0	20	0	20

**Sérums positifs en anti-LKM1 (n=23) :** sérums de 15 patients atteints d'hépatite auto-immune de type 2 et 8 patients atteints d'hépatite auto-immune de type 2 associée à une hépatite chronique C, tous positifs en IFI sur des coupes de triple substrat (foie, rein, estomac de rat) ainsi qu'avec une trousse ELISA utilisant du P450 2D6 recombinant.

		ELISA		IFI	
		+	-	+	-
DOT GA	+	23	0	23	0
	-	0	20	0	20

**Sérums positifs en anti-LC1 (n=10) :** sérums de 10 patients positifs en IFI sur coupes de foie de rat et en immunodiffusion radiale (IR) utilisant un extrait de foie de rat comme antigène.

		IFI		IR	
		+	-	+	-
DOT GA	+	10	0	10	0
	-	0	20	0	20

**Sérums positifs en anti-SLA (n=5) :** sérums de 5 patients atteints d'hépatite auto-immune, positifs en ELISA (Inova, USA) et dans un Western Blot utilisant un extrait de foie de rat.

		ELISA		WB	
		+	-	+	-
DOT GA	+	5	0	5	0
	-	0	20	0	20



**Sérums positifs en anti-F-actine (n=29) :** 29 sérums positifs en anti-muscle lisse (ASMA) en IFI sur coupes de triple substrat (foie, rein, estomac de rat).

		IFI (ASMA)	
		+	-
DOT GA	+	28	0
	-	1	20

## Protocole résumé

1	Amener tous les réactifs et le nombre requis de bandelettes à température ambiante (18-25 °C).
2	Placer les bandelettes avec le côté réactionnel en haut et distribuer 2 ml de solution de lavage (préparée à partir de B) dans chaque canal.
3	Sceller le plateau et incubé sous agitation 10 minutes à température ambiante (18-25 °C).
4	Éliminer la solution de lavage.
5	Pipeter 1,5 ml de diluant des échantillons (C) et 10 µl de sérum ou de plasma de patient (1+150) dans chaque canal.
6	Incuber sous agitation 30 minutes à température ambiante (18-25 °C).
7	Décanté et laver les bandelettes sous agitation 3 x 3 minutes avec 1,5 ml de tampon préparé à partir de B.
8	Pipeter 1,5 ml de conjugué (D) dans chaque canal.
9	Incuber sous agitation 30 minutes à température ambiante (18-25 °C).
10	Décanté et laver les bandelettes sous agitation 3 x 3 minutes avec 1,5 ml de tampon préparé à partir de B.
11	Pipeter 1,5 ml de substrat (E) dans chaque canal.
12	Couvrir le plateau et incubé sous agitation 10 à 12 minutes à température ambiante (18-25 °C).
13	Décanté et laver les bandelettes 3 minutes sous agitation avec 1,5 ml de tampon préparé à partir de B.
14	Décanté et sécher les bandelettes en les pressant sur du papier absorbant. Lire les résultats après 30 minutes.

## Précautions 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 sont à suivre.
- 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.
-  • Certains des réactifs contiennent de faibles quantités de bromonitrodioxane (<0,01% v/v), de méthylisothiazolone (<20ppm) ou d'azoture de sodium (<0,05% p/v) en tant qu'agent conservateurs. Ils ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses.
-  • Comme la trousse contient certaines substances présentant un risque biologique, observer les précautions suivantes :
  - Ne pas fumer, manger ou boire lors de la manipulation des réactifs.
  - Toujours utiliser des gants de protection.
  - Ne jamais pipeter avec la bouche.
  - Nettoyer rapidement les réactifs renversés et bien laver la surface avec un décontaminant.

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)