



Triple IFA MODE D'EMPLOI







96 déterminations

REF 85096



Test d'immunofluorescence indirecte pour la détection des ANA/AMA/ASMA/APCA dans le sérum humain.

Substrat : foie, estomac et rein de rat

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

INTRODUCTION

Le triple IFA est destiné à la recherche qualitative ou semi-quantitative des auto-anticorps des classes IgA, IgG et IgM dirigés contre les antigènes nucléaires (ANA), les mitochondries (AMA), les muscles lisses (ASMA) et les cellules pariétales (APCA) dans le sérum humain.

Le terme anticorps anti-nucléaires (**ANA**) englobe tous les anticorps dirigés contre des antigènes du noyau cellulaire. Ils constituent des indicateurs biologiques importants du Lupus érythémateux disséminé (LED), des sclérodermies, du syndrome de Gougerot-Sjögren et des connectivites mixtes.

Si la détection des ANA constitue une étape très importante dans le diagnostic biologique des ces affections, il convient de rappeler que les anticorps anti-nucléaires peuvent apparaître dans le sérum à la suite d'une infection, de diverses maladies virales, d'une hépatite, d'une mononucléose, d'une leucémie, d'un lymphome, d'un mélanome... En outre, les ANA sont souvent présents lors d'une hépatite chronique, d'une cirrhose biliaire primitive, d'une thyroïdite ou d'une encéphalite allergique. Des titres faibles peuvent être détectés chez des individus sains ou induits par la prise d'un médicament.

Les anticorps anti-mitochondries (**AMA**) reconnaissent des structures antigéniques présentes au niveau des feuillettes internes ou externes (riches en phospholipides) de ces organelles. Ces anticorps sont principalement associés à la cirrhose biliaire primitive, au pseudo lupus au Venecorane, à différentes formes d'hépatites chroniques. Des titres élevés constituent un très bon marqueur de la cirrhose biliaire primitive puisqu'ils sont présents dans 90% des cas et bien souvent avant l'apparition des symptômes cliniques. Le titre est généralement insensible au traitement.

Les anticorps anti-muscle lisse (**ASMA**) sont présents dans différentes pathologies hépatiques telles que les hépatites aiguës et chroniques, dans la cirrhose biliaire primitive et dans d'autres formes de cirrhoses. Leur présence est également compatible avec un diagnostic de lupus érythémateux disséminé, d'une mononucléose infectieuse, d'un cancer du sein ou de l'ovaire, ou d'un mélanome malin.

Les anticorps anti-cellules pariétales gastriques (**APCA**) sont généralement associés à une anémie pernicieuse. Toutefois, ils sont également présents dans un certain nombre de pathologies gastriques (ulcère, gastrite chronique atrophique), des atteintes thyroïdiennes (thyroïdite de Hashimoto, myxoedème) et plus rarement dans le diabète de type I et dans l'anémie microcytaire hypochrome.

PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse Triple IFA est une méthode d'immunofluorescence indirecte pour la détection qualitative ou semi-quantitative des ANA, AMA, ASMA et APCA.

Les anticorps des sérums de patients dilués et des contrôles réagissent avec les antigènes spécifiques des coupes de tissus fixés sur les lames au cours d'une première incubation de 30 minutes à température ambiante.

Après lavage, un anticorps polyvalent anti-immunoglobulines humaines conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) se lie aux auto-anticorps précédemment retenus sur la lame.

Au terme d'une seconde incubation de 30 minutes à température ambiante, l'excès de conjugué est éliminé par lavage.

Les lames ainsi révélées sont examinées avec un microscope à fluorescence (longueur d'onde d'excitation 490 nm / longueur d'émission 520 nm).

ECHANTILLONS DES PATIENTS

Prélèvement et conservation des échantillons

Le sang est prélevé par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum est récupéré par centrifugation.

Les échantillons hémolysés ou lipidiques ne peuvent pas être utilisés avec cette trousse. Eviter les échantillons contaminés qui pourraient contenir des protéases susceptibles de digérer les substrats cellulaires.

Eviter les congélations/décongélations répétées. Dans le cas d'utilisations multiples, aliquoter les échantillons et les stocker à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Préparation avant utilisation

Laisser les échantillons atteindre la température ambiante. Prendre soin d'agiter les échantillons de sérum pour obtenir une certaine homogénéité.

Les échantillons peuvent être conservés à $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à 2 jours. Pour un stockage prolongé, il est préférable de les stocker à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dépistage : diluer les échantillons de sérum 1:20 (v/v), par exemple 10 μl d'échantillon + 190 μl de tampon PBS préparé à partir de C.

Titrage : préparer une série de dilutions au quart à partir de la dilution 1:20 en utilisant du tampon PBS préparé à partir de C. Exemple : 100 μl de dilution 1:20 + 300 μl de tampon PBS (préparé à partir de C). On obtient ainsi les dilutions 1:80, 1:320, 1:1280...

Composition du kit pour 96 déterminations

A	Lames de tissus Lames de 8 puits avec des coupes de foie, d'estomac et de rein de rat	12 lames scellées sous vide
	Ag 8	
C	Tampon PBS Poudre pour 2 x 100 ml de tampon PBS	2 x 10 g.
	BUF PBS	
D	Conjugué Contient des anticorps polyvalents de chèvre anti-IgG humaines (H+L) marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine, avec du bleu Evans,	2 flacons compte-gouttes de 3 ml Prêt à l'emploi Bouchon bleu
	CONJ	
E	Solution de montage Contient de la glycérine tamponée PH 7,4 +/- 0,2	1 flacon compte-gouttes de 3 ml Prêt à l'emploi Bouchon blanc
	MOUNT	
F	Buvards	12
	TEMPL	
G	Couvre-objets Lamelles de 22 x 70 mm	12
	COVER	
N	Contrôle négatif Sérum humain dilué	1 flacon compte-gouttes de 1 ml Prêt à l'emploi Bouchon vert
	CONTROL -	
P	Contrôle positif Sérum humain dilué Spécificité et titre : voir étiquette du flacon	1 flacon compte-gouttes de 1 ml Prêt à l'emploi Bouchon rouge
	CONTROL +	

Matériel non fourni

- Tubes à usage unique et portoir.
- Micropipettes 10, 100 et 1000 µl.
- Micropipettes de précision, 10 and 20 µl.
- Chambre humide (ou boîte de pétri contenant du papier absorbant humecté avec de l'eau désionisée).
- Deux cuvettes à coloration.
- Flacon d'un litre (tampon PBS).
- Pissette
- Microscope à fluorescence équipé d'un filtre d'excitation à 490 nm et d'un filtre d'arrêt à 520 nm.

Format et conservation

La trousse Triple IFA 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, les composants sont stables 8 semaines pour autant qu'ils soient stockés correctement.

Préparation avant l'emploi

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

A- Les lames sont emballées individuellement. N'ouvrir que la quantité nécessaire de lames après les avoir ramenées à température ambiante.

C- Préparation du tampon PBS : dissoudre une dose de PBS dans un bécher d'1 litre et porter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée ou désionisée. Dissoudre les sels à l'aide d'un agitateur magnétique. Le tampon reconstitué doit avoir un pH de 7,4 +/- 0,2. Conserver le tampon dans une bouteille propre à une température \leq à 25°C. La solution est stable pendant 2 mois. Ne pas utiliser en cas de changement de pH ou si la solution devient trouble ou en cas de formation d'un précipité.

D- Eviter d'exposer le conjugué à la lumière.

PROTOCOLE DE DOSAGE

- **Diluer les sérums des patients avec le tampon PBS (dépistage ou titrage).**
 - **Ne jamais laisser sécher les puits pendant toute la procédure.**
1. Mélanger doucement les réactifs en évitant la formation de mousse. Sortir les lames de leur emballage et identifier les avec un marqueur permanent.
 2. Appliquer
 - 1 à 2 gouttes (30-50 μ l) de contrôle positif et de contrôle négatif
 - 1 à 2 gouttes (30-50 μ l) des échantillons sériques dilués des patientsVeiller à recouvrir la totalité de la surface du puits sans toucher la surface de la lame.
 3. Incuber 30 minutes à température du laboratoire dans une chambre humide.

4. **Laver les lames au PBS :**
 - Laver les lames **une par une**.
 - Ne jamais laisser sécher les puits : les lames ne doivent pas rester hors de la chambre humide **plus de 15 secondes** avant d'être immergées dans le bac de lavage.
 - Ne jamais utiliser de l'eau distillée ou déminéralisée pour le lavage des lames.
 - **Retirer une lame de la chambre humide et l'incliner à 45°; à l'aide d'une pissette, arroser doucement de PBS la ligne médiane de la lame, de manière à rincer d'abord les puits 1 à 4, puis en modifiant l'inclinaison de la lame, les puits 5 à 8. Ne jamais diriger le jet de PBS directement sur les puits.**
 - Transférer **immédiatement** les lames rincées dans un bac de lavage rempli de PBS; temps d'immersion : **5 minutes**.
 - Agiter brièvement le bain une première fois après que toutes les lames y soient déposées, puis une deuxième fois à la fin du temps de lavage.
 - Répéter cette étape avec un deuxième bain de PBS.

5. **Déposer le conjugué fluorescent**
 - Traiter les lames une par une.
 - **Ne jamais laisser les lames sécher à l'air libre** : cette étape est l'une des plus critiques du mode opératoire et **ne doit pas prendre plus de 15 secondes** avant le retour de la lame en chambre humide.
 - Retirer la lame de la cuve à coloration et absorber l'excès de tampon en la tapotant rapidement sur du papier absorbant; ne pas sécher la lame. Sécher soigneusement la périphérie des puits en utilisant un buvard (F). Déposer une goutte de conjugué (D) sur chaque puits en veillant à ce que la surface de chaque puits soit complètement recouverte.
 - Replacer **immédiatement** la lame dans la chambre.

6. Incuber 30 minutes à l'abri de la lumière à température du laboratoire dans une chambre humide.

7. **Laver les lames au PBS :**
 - Laver les lames **une par une**.
 - Ne jamais laisser sécher les puits : les lames ne doivent pas rester hors de la chambre humide **plus de 15 secondes** avant d'être immergées dans le bac de lavage.
 - Ne jamais utiliser de l'eau distillée ou déminéralisée pour le lavage des lames.
 - **Retirer une lame de la chambre humide et l'incliner à 45°; à l'aide d'une pissette, arroser doucement de PBS la ligne médiane de la lame, de manière à rincer d'abord les puits 1 à 4, puis en modifiant l'inclinaison de la lame, les puits 5 à 8. Ne jamais diriger le jet de PBS directement sur les puits.**
 - Transférer **immédiatement** les lames rincées dans un bac de lavage rempli de PBS; temps d'immersion : **5 minutes**.
 - Agiter brièvement le bain une première fois après que toutes les lames y soient déposées, puis une deuxième fois à la fin du temps de lavage.
 - Répéter cette étape avec un deuxième bain de PBS.

8. **Montage des couvre-objets**
 - Placer un nombre approprié de lamelles couvre-objets sur un papier absorbant.
 - Ajouter 2 à 4 gouttes de solution de montage (E) au bas de chaque couvre-objet.

- Retirer les lames du bain une par une et éliminer l'excès de PBS en tapotant la lame sur du papier absorbant. Sécher soigneusement la périphérie des puits en utilisant un buvard (F). **NE PAS ESSUYER** les lames et **NE PAS LES LAISSER SECHER** à l'air, le couvre-objet doit être placé dans les **15 SECONDES** suivant la sortie du bain.

- Positionner le bas de la lame contre le bas du couvre-objet puis abaisser doucement la lame sur le couvre-objet en s'assurant que la Solution de Montage migre jusqu'en haut de la lame sans laisser de poches d'air. **NE PAS UTILISER** un excès de solution de montage : ceci aurait pour effet de donner une image floue ou de créer une fluorescence parasite.

9. **Observer** les lames au microscope à fluorescence. Lorsque les lames révélées ne peuvent pas être examinées dans les 2 ou 3 jours qui suivent, les conserver dans une chambre humide enveloppée d'une feuille d'aluminium et placée à 2-8 °C. Pour des périodes de conservation plus longues, sceller les lames en utilisant du vernis à ongles et conserver à -20°C.

LECTURE DES RÉSULTATS

Intensité de la fluorescence

L'intensité de la fluorescence peut être semi-quantifiée selon une échelle établie par le "Center for Disease Control" (CDC) d'Atlanta, en Géorgie (USA).

4+ : fluorescence jaune-vert brillant d'intensité maximale

3+ : fluorescence jaune-vert moins brillante

2+ : image caractéristique mais fluorescence assez faible

1+ : faible fluorescence

L'intensité de la fluorescence n'a pas de signification clinique et n'a qu'une valeur limitée quant au titre de l'échantillon. Selon le microscope, les filtres et la lampe, le même échantillon peut fournir une intensité de fluorescence de +/-1.

Résultat négatif

Une dilution d'un échantillon est considérée comme négative pour la recherche des ANA, ASMA, AMA ou APCA si l'intensité de la fluorescence est inférieure à 1+ et si l'image n'a pas d'aspect caractéristique. Les coupes apparaîtront rouge-orangé en raison de la présence du bleu Evans.

Résultat positif

Une dilution d'un échantillon est considérée comme positive si l'intensité de fluorescence est supérieure ou égale à 1+ avec un aspect clairement identifiable pour au moins l'une des coupes de tissus.

La combinaison de tissus permet d'identifier plusieurs auto-anticorps sur 1 seul puits. Toutefois, lorsque plusieurs auto-anticorps sont présents dans le même échantillon, il est conseillé d'utiliser des analyses complémentaires pour affiner le diagnostic.

ANA : les échantillons positifs reconnaissent les noyaux des cellules de foie. Les échantillons fortement positifs devraient être titrés pour déterminer des aspects cachés ou des fluorescences pléomorphiques. Il est conseillé de les tester sur cellules Hep-2 (réf. ANA-120 ou ANA-240).

AMA : les échantillons positifs présentent une fine fluorescence granitée dans le cytoplasme des tubules sur rein de rat. En présence d'anticorps anti-M2, la fluorescence est plus intense dans les tubules distaux que dans les tubules proximaux.

ASMA : en présence d'anticorps anti-muscles lisses, la fluorescence est localisée au niveau de la paroi des vaisseaux du rein et de l'estomac ainsi qu'au niveau de la musculaire-muqueuse, de la musculuse.

ACA : les échantillons positifs présentent une fine fluorescence granitée de la muqueuse gastrique. En cas de fluorescence positive, il est impératif d'effectuer la recherche d'anti-mitochondries qui réagissent également avec la muqueuse gastrique de rat. L'examen sur coupe de rein de rat permet d'effectuer le diagnostic différentiel.

En outre, plusieurs autres auto-anticorps peuvent être identifiés sur ce triple substrat, en particulier les anti-LKM puis les anti-cytosol hépatique.

Titrage

En cas de détermination semi-quantitative, le résultat est donné sous la forme du titre de la dilution la plus élevée pour laquelle on obtient une intensité de fluorescence 1+ avec une image caractéristique.

Lorsque l'on travaille avec des dilutions au quart, il est possible d'extrapoler le titre final.

Exemple :

1:20 = 3+

1:80 = 2+

1:320 = -

Le titre extrapolé est 1:160.

VALEURS DE REFERENCE

Triple IFA	Titre
Négatif	< 20
Positif	≥ 20

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

Une faible fluorescence avec des titres entre 1:20 et 1:40 ou une incohérence avec le tableau clinique doivent entraîner un nouveau dosage à 3 ou 4 semaines d'intervalle.

Le titre peut varier selon le type de microscope utilisé et le jugement de l'observateur.
Les échantillons et les solutions de lavage contaminés par des bactéries ou des champignons peuvent entraîner des fluorescences non spécifiques.

La présence de protéases peut entraîner une détérioration des coupes de tissus.

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.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

- Introduire le contrôle positif et le contrôle négatif dans chaque série de manière à vérifier la reproductibilité, la spécificité et la sensibilité de l'analyse
- Le **contrôle positif** doit fournir une fluorescence des coupes de tissus avec une intensité comprise entre 3+ et 4+. S'il est titré, le titre obtenu doit correspondre à celui figurant sur l'étiquette +/- une dilution au double.
- Le **contrôle négatif** doit fournir une fluorescence inférieure à 1+ et un aspect rouge-orangé dû à la contre-coloration.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

ANA :

- 1:20 – 1:80 Une réaction positive est fréquemment observée dans la polyarthrite rhumatoïde et des les connectivites mixtes. Une augmentation du titre dans le temps peut indiquer un lupus en poussée.
- > 1:160 Suggère une pathologie auto-immune aigue avec dans 80% des cas un lupus.

AMA :

- 1:20 – 1:80 Ces réactions sont fréquentes dans de nombreuses hépatopathologies.
- > 1:160 Suggère une cirrhose biliaire. Les titres restent stables sur de longues périodes et en dépit du traitement de sorte que le titrage n'a pas de signification par rapport à l'efficacité du traitement.

ASMA :

- 1:20 – 1:80 Ces réactions sont fréquentes dans de nombreuses hépatopathologies, les hépatites virales et les cirrhoses biliaires primitives. Toutefois, chez ces patients les titres peuvent descendre au dessous de la limite de sensibilité. On observe également des titres faibles chez des patients atteints d'infections de la vésicule biliaires, de cirrhoses alcooliques, chez les lupiques et dans 2% de la population normale.
- 1:160 Suggère une hépatite auto-immune de type I. A l'inverse d'une hépatite virale, le titre reste relativement constant pendant plusieurs années. La mononucléose peut également entraîner des titres élevés en ASMA.

APCA : Le titre ne fournit aucune information sur l'état du patient. UN résultat positif doit être complété par la recherche d'anticorps anti-facteur intrinsèque et par d'autres examens biologiques.

PROTOCOLE RESUME



Diluer les échantillons des patients avec le tampon PBS (préparé à partir de C) selon le mode d'analyse choisi : dépistage ou titrage.

1	Amener tous les réactifs à température ambiante (20 à 25°C)		
		Contrôles	Patient 1 etc.
2	Ajouter	1 à 2 gouttes (30 - 50 µl)	30 - 50 µl
3	Incuber	30 minutes à température ambiante	
4	Laver avec du tampon PBS préparé à partir de C		
5	Ajouter le conjugué (D)	1 à 2 gouttes (30 - 50 µl)	1 à 2 gouttes (30 - 50 µl)
6	Incuber	30 minutes à température ambiante	
7	Laver avec du tampon PBS préparé à partir de C		
8	Placer les lamelles couvre-objets		
11	Observer au microscope à fluorescence		

RÉFÉRENCES

1. Tan EM: Antibodies to nuclear antigens (ANA) and their immunobiology and medicine. Adv Immunol 1982 33:167-240
2. Tan EM, Cohen AS, Fries JF et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982 25:1271-7
3. Humbel RL: Autoanticorps et Maladies Auto-Immunes, Elsevier 2e edition, 1997
4. Zachou K, Rigopoulou E, Dalekos GN: Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. J Autoimmune Dis 2004, 1:2
5. Lyster HC, Forrester FT: The Immunofluorescence (IF) test. In: Immunofluorescence methods in virology, USDHHS, Georgia, 1979, 71-81

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 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

Website : www.labodia.com