

REF **504225, 504225.10**

Application

Les lames de cervelet/cerveau de singe et estomac de souris sont utilisées en immunofluorescence indirecte pour la détection d'une gamme d'autoanticorps neurologiques.

Informations concernant le test

Les autoanticorps Yo (PCA-1), Hu (ANNA-1), Ri (ANNA-2), Tr (PCA-2), CV2, amphiphysine et Ma peuvent être détectés avec ce substrat composé. Une variété d'aspects peut être rencontrée et de la bibliographie s'y reportant peut être consultée pour aider à l'interprétation.¹ Le marquage du plexus mésentérique de l'estomac de souris peut aider à la différenciation des autoanticorps anti-Hu (marquage positif) des autoanticorps anti-Ri (négatif).

Principe du test

Ces lames sont utilisées en immunofluorescence indirecte. Les sérum de patients sont incubés sur les coupes. Les anticorps non fixés sont éliminés par lavage. Un marquage fluorescent permet de révéler les auto-anticorps spécifiques. La lecture des lames s'effectue à l'aide d'un microscopie à fluorescence. La positivité des échantillons se traduit par un marquage fluorescent de certaines régions de la coupe sur lesquelles sont accrochés les auto-anticorps.²

Contenu du coffret

Lames de cervelet/cerveau de singe et estomac de souris de 5 trous emballées individuellement dans un sachet aluminium contenant un dessicateur.

Avertissements/Précautions

Les échantillons testés pouvant être infectés, il est nécessaire de les manipuler avec précaution. Seul un personnel formé est autorisé à utiliser ce réactif.

Conditions de conservation

Les lames non ouvertes doivent être stockées à 2-8°C et peuvent être utilisées jusqu'à la date de péremption. NE PAS CONGÉLER. Lorsque les lames sont sorties de leur étui, les utiliser immédiatement.

Echantillons

Prélever de façon stérile et par ponction veineuse un échantillon de sang. Laisser le sang coaguler à température ambiante, puis séparer le sérum du caillot dès que possible pour éviter l'hémolyse. Le sérum peut être conservé à 2-8°C pendant 7 jours avant les tests.³ Pour une conservation plus longue, il est recommandé de l'aliéquer et de le congeler à -20°C ou à une température inférieure. Ne pas congeler et décongeler les sérum plus d'une fois. Il est recommandé d'utiliser des sérum non lipidiques, non hémolysés et non contaminés par des bactéries qui induiraient des titres faibles ou des aspect de marquage non clairs.

Procédure

Matériel fourni

1. Monkey Cerebellum/Cerebrum/Mouse Stomach Slide – 1 x 5 well or
2. NOVA Lite Monkey Cerebellum/Cerebrum & Mouse Stomach Slide Pack – 10 x 5 well.

Autre matériel nécessaire non fourni

1. Tampon PBS comme diluant des échantillons et pour les lavages.
2. Récipient pour le tampon PBS
3. Micropipettes et cônes pour le dépôt des échantillons.
4. Chambre humide pour les étapes d'incubation
5. Microscope à fluorescence avec un filtre excitant à 495nm et un filtre barrière à 515nm
6. Flacon plastique pour le lavage initial en PBS

D'autres réactifs peuvent être obtenus chez Inova Diagnostics : PBS Concentrate (40x) (508002), IFA System Negative Control (508186), Hu (ANNA-1) Positive Control (504073), Yo (Purkinje Cell) Positive Control (504009), FITC IgG (H&L) Monkey Adsorbed Conjugate (504011, 504071), 1% Evans Blue (504049) et PVA Mounting Medium (504046, 504047).

Procédure

Contrôle de qualité

Les contrôles positifs et négatifs doivent être utilisés à chaque série de tests.

1. Milieu de montage : Sortir le milieu de montage du réfrigérateur pour qu'il atteigne la température ambiante (18-28°C) avant d'être utilisé.
2. Dilution des échantillons.
Dépistage : Diluer les échantillons au 1/50 et 1/500 en ajoutant 10µL de sérum à 490µL de tampon PBS et 5µL de sérum à 2495µL de tampon PBS respectivement.
Titration : Faire une série de dilution en tampon PBS sur les échantillons dépistés positifs (1/50, 1/100, 1/200 et 1/400...).
Par exemple : prendre 100µL de la dilution au 1/50 et mélanger avec 100µL de tampon PBS pour donner une dilution au 1/100 (Répéter pour les dilutions suivantes).
3. Lames. Les ramener à température ambiante avant de les sortir de leur emballage. Les marquer puis les déposer dans une chambre humide. Déposer immédiatement 50-100µL de contrôles ou de sérum de patient dilué au 1/50 et 1/500.
4. Incubation des lames. Incuber les lames pendant 30 minutes en chambre humide à température ambiante (18-28°C).

5. Lavage. Sortir les lames de la chambre humide et les rincer rapidement à l'aide d'une pissette contenant du tampon PBS. Ne pas diriger le jet directement sur les puits. Mettre les lames sur un portoir et les immerger en PBS sous agitation lente pendant 5 à 10 minutes.
6. Conjugue fluorescent. Eliminer l'excès de PBS et sécher le pourtour des puits à l'aide de buvards ou de papier absorbant. Remettre les lames en chambre humide et couvrir immédiatement chaque puits avec une goutte de conjugué IgG (H+L) FITC. NE PAS LAISSER LES PUITS A L'AIR PENDANT PLUS DE 15 SECONDES. L'utilisation du conjugué spécial tissus de singe (504011) permet d'obtenir de meilleurs résultats.
7. Incubation des lames. Incuber les lames pendant 30 minutes en chambre humide à température ambiante. Recouvrir la chambre humide de papier pour éviter l'exposition à la lumière.
8. Lavage. Procéder comme à la section 5. Il est possible de contrecolorer les lames en ajoutant 2 à 3 gouttes de Bleu d'Evans à 1% pour 100mL de PBS avant immersion des lames.
9. Montage des lames. Sortir les lames une à une du PBS. Sécher rapidement le pourtour des puits puis déposer une goutte de milieu de montage dans chaque puits. Déposer la lamelle en évitant la formation de bulles d'air. Ne pas essayer d'éliminer les bulles d'air éventuellement apparues. Essuyer l'excès de milieu de montage.
10. Lecture des lames. La lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les lames peuvent être stockées pendant 3 jours à 2-8°C l'obscurité sans diminution de l'intensité de fluorescence.

Résultats

Contrôle de qualité

Un sérum contenant des autoanticorps anti-cellules Purkinje doit donner un marquage vert fluorescent du cytoplasme des cellules de Purkinje.

Un sérum contenant des autoanticorps ANNA-1 doit donner un marquage fluorescent granulaire de la plupart des noyaux neuronaux du cervelet, incluant les cellules de Purkinje.

Un contrôle négatif doit donner un marquage vert pâle dans tous les tissus sans fluorescence discernable.

Si les contrôles n'apparaissent pas comme décrits ci-dessus, le test est invalide et doit être répété.

Interprétation des résultats

Cf références 1 pour des photographies couleur de cet aspect. Les résultats sont rendus comme négatifs ou positifs.

N.B : Chaque laboratoire doit établir le seuil de positivité à partir duquel il y a signification clinique.

Limites du test

1. La qualité des filtres, des optiques et de la source lumineuse peut influencer la sensibilité du test. Les performances du microscope sont affectées par le centrage et le changement de la lampe.
2. L'utilisation de réactifs pour immunofluorescence provenant d'autres fournisseurs n'ont pas été testés mais elle n'est pas impossible.
3. Les aspects positifs des autoanticorps n'apportent qu'une aide au diagnostic et ne constituent pas un diagnostic en soit. Les résultats du test doivent tenir compte des autres résultats du laboratoire et du suivi clinique du patient.

Résumé de la procédure

1. Placer le milieu de montage à température ambiante.
2. Diluer le PBS dans de l'eau distillée ou déionisée.
3. Diluer les sérums au 1/50 et 1/500 dans du PBS.
4. Ramener les lames à température ambiante (18-28°C).
5. Déposer 50µL à 100µL de contrôles positifs et négatifs et les sérums de patients dilués dans les puits.
6. Incuber 30 minutes en chambre humide.
7. Laver 5 à 10 minutes en tampon PBS.
8. Sécher autour des puits et couvrir immédiatement chaque puits avec une goutte de conjugué.
9. Incuber comme à l'étape 6.
10. Laver comme à l'étape 7.
11. Monter les lames.
12. Visualiser sous un microscope à fluorescence.

Symboles utilisés

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Conformité aux normes européennes
	Représentant européen agréé
	Limite de température
	Code du lot
	Numéro de catalogue ou référence
	Fabricant
	Date de péremption
	Contenu suffisant pour <n> Tests
	Consulter les instructions d'utilisation.

Références

1. Bradwell A R et al. (2008). Atlas of Tissue Autoantibodies (Third Edition) Publ. The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
2. Weller T H & Coons A H (1954). Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in vitro: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **86**: 789-794.
3. Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004. Ed. A Milford Ward, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

Fabricant:

Inova Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America
Technical Service (Outside the U.S.) : 1 858-805-7950
support@inovadx.com

Australian Sponsor:

Werfen Australia Pty Ltd
59-61 Dickson Avenue
Artarmon NSW 2064 Australia
Tel. +61 2 9098 0200 / 1300 369 132
<http://au.werfen.com/>

Représentant Autorisé:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

624225FR

Mai 2019
Révision 6

