

NOVA Lite[®] Rat Liver, Kidney, Stomach Kit

Uniquement pour "Diagnostics *In-Vitro*"

Complexité de CLIA: Haut

REF

704170, 704180
504170.10, 504180.25
504170, 504180

Rx Only

Application

Ces coffrets sont destinés au dépistage et au titrage des autoanticorps circulants dans le sérum humain. Ils apportent une aide au diagnostic et au traitement de plusieurs maladies autoimmunes. Les quatre principaux autoanticorps détectés sont les anti-nucléaires (ANA), les anti-mitochondries (AMA), les anti-muscle lisse (ASMA) et les anti-cellules pariétales gastriques (AGPCA).

Informations concernant le test

L'immunofluorescence indirecte est la méthode de choix pour le dépistage et le titrage des autoanticorps circulants dans le sérum humain. Les coupes de tissus d'origine animale, comme le rat, sont généralement préférées aux autres substrats habituellement utilisés comme les tissus humains et les préparations de cellules; ceci est dû à l'absence d'interférence avec le système HLA et/ou les autres anticorps dirigés contre les groupes sanguins. L'utilisation des trois tissus différents (foie, rein et estomac) permet d'identifier plus facilement les autoanticorps en comparant les résultats obtenus avec chaque tissu.

Des autoanticorps particuliers sont associés à différentes maladies. Les ANA sont presque toujours présents dans le lupus érythémateux disséminé (LED) mais sont aussi communément trouvés chez des patients atteints de maladies rhumatoïdes et de connectivites. Les AMA sont fréquemment retrouvés dans les cirrhoses biliaires primitives mais peuvent aussi être détectés chez des patients atteints d'autres maladies du foie. Les ASMA sont fréquemment associés aux hépatites chroniques en phase active et aux cirrhoses biliaires primitives mais ils sont également présents en faibles concentrations dans d'autres conditions. Les AGPCA sont présents dans le sérum de la plupart des patients atteints d'anémie pernicieuse. Une description plus détaillée de l'association des autoanticorps avec certaines maladies est donnée dans la Résultats section.¹⁻⁹

Principe du test

Ce coffret fait appel à une technique d'immunofluorescence indirecte.¹⁰ Les sérums de patients et les contrôles appropriés sont incubés sur les coupes de tissus. Les anticorps non spécifiques sont éliminés par lavage. Un conjugué approprié marqué à la fluorescéine est appliqué. Le conjugué non lié est éliminé par lavage et la lecture des lames s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence. La positivité des échantillons se traduit par un marquage fluorescent de certaines régions de la coupe de tissus sur lesquelles sont accrochés les autoanticorps.

Contenu du coffret

1. Lames de 5 ou 10 puits recouverts de coupes de foie, rein et estomac de rat, avec dessiccateur

Coffrets uniquement

1. Un sérum de contrôle positif donnant un Homogène ANA Aspect. **Il est fourni prédilué** et contient de l'azide de sodium à 0,09%
2. Un sérum de contrôle négatif système IFA, universellement négatif pour tous les autoanticorps. **Il est fourni prédilué** et contient de l'azide de sodium à 0,09%
3. Un antisérum de mouton anti IgG humaines, purifié par affinité et couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine. **Il est fourni prédilué** et contient de l'azide de sodium à 0,09%
4. Un sérum de contrôle positif Mitochondrie (AMA) Aspect. **Il est fourni prédilué** et contient de l'azide de sodium à 0,09%.
5. Un sérum de contrôle positif Muscle Lisse (ASMA) Aspect. **Il est fourni prédilué** et contient de l'azide de sodium à 0,09%.
6. Bleu d'Evans à 1%. Contre coloration optionnelle
7. Tampon PBS II. Solution liquide concentrée 40 fois
8. Buvards pour sécher les lames
9. Milieu de montage, contenant un agent « anti-fading » (DABCO, 1, 4 diazabicyclo (2.2.2) octane)
10. Lamelles

Avertissements/Précautions

Le sérum humain fourni par tous les donneurs (trousses uniquement) a été testé et s'est avéré négatif pour l'antigène de surface de l'hépatite B et pour les anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH 1 et 2). Cependant, ces tests ne permettent pas de garantir l'absence d'agents infectieux. Comme pour toutes les substances potentiellement infectieuses, des méthodes de manipulation et d'élimination appropriées doivent être établies et seul un personnel correctement formé à ces méthodes doit être autorisé à effectuer les procédures.

Le Bleu d'Evans et les contrôles de la trousse contiennent de l'azoture de sodium à 0,09 % comme conservateur et doivent être manipulés avec précaution : ne pas les ingérer ni les placer en contact avec la peau ou les membranes muqueuses. En cas de contact, laver abondamment à l'eau et consulter un médecin. Des azides métalliques explosifs sont susceptibles de se former avec le plomb et le cuivre des canalisations ; lors de l'élimination du réactif, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide. Ce produit ne doit être utilisé que par des personnes convenablement formées aux fins énoncées. Il est recommandé de respecter la procédure indiquée.

L'adaptation de ce test pour une utilisation en tout ou partie avec des passeurs d'échantillons automatiques et d'autres dispositifs de manipulation de liquides peut générer des différences dans les résultats des tests par rapport à ceux obtenus en utilisant la procédure manuelle. Il appartient à chaque laboratoire de vérifier que les résultats de tests produits par sa procédure automatisée se situent dans des limites acceptables.

Conditions de conservation

Les coffrets non ouverts doivent être stockés à 2-8°C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Ne pas congeler. Lorsque les lames sont sorties de leur étui, les utiliser immédiatement. Le tampon PBS II dilué peut être stocké plus d'un mois à 2-8°C. Le conjugué FITC doit être conservé à l'obscurité et à 2-8°C. Tous les autres réactifs peuvent être stockés à 2-8°C.

Echantillons

Prélever de façon stérile et par ponction veineuse de sang. Laisser le sang coaguler à température ambiante, puis séparer le sérum du caillot dès que possible pour éviter l'hémolyse. Les sérums peuvent être conservés à 2-8°C pendant 7 jours avant les tests¹¹ ou aliquotés et congelés à -20°C minimum pour une conservation plus longue. Les congélations et décongélations successives peuvent donner des résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Ramener le sérum à température ambiante avant les tests. Il est recommandé d'utiliser des sérums non lipidiques, non hémolysés et non contaminés par des bactéries car les titres peuvent être moins élevés ou les aspects peuvent être difficilement identifiables.

Procédure

Matériel fourni (coffret)

704170

1. 10 x *Rat Liver/Kidney/Stomach Slide (5 well)*
2. 1 x 1mL *ANA Homogeneous Pattern*, prêt à l'emploi
3. 1 x 1mL *IFA System Negative Control*, prêt à l'emploi
4. 1 x 1mL *Mitochondrial (AMA) Pattern*, prêt à l'emploi
5. 1 x 1mL *Smooth Muscle (ASMA) Pattern*, prêt à l'emploi
6. 1 x 7mL *FITC IgG (H&L) Conjugate*
7. 1 x 3mL *1% Evans Blue*
8. 2 x 25mL *PBS II Concentrate (40x)*
9. 1 x 3mL *PVA Mounting Medium*
10. 20 x *Blotters*
11. 10 x *Coverslips*

704180

1. 25 x *Rat Liver/ Kidney/Stomach slide (10 well)*
2. 1 x 1mL *ANA Homogeneous Pattern*, prediluido
3. 1 x 1mL *IFA System Negative Control*, prediluido
4. 1 x 1mL *Mitochondrial (AMA) Pattern*, prediluido
5. 1 x 1mL *Smooth Muscle (ASMA) Pattern*, prediluido
6. 1 x 15mL *FITC IgG (H&L) Conjugate*
7. 1 x 3mL *1% Evans Blue*
8. 2 x 25 *PBS II Concentrate (40x)*
9. 1 x 10mL *PVA Mounting Medium*
10. 50 x *Blotters*
11. 25 x *Coverslips*

Matériel fourni (Lames seules)

1. **504170.10** - 10 x *Rat Liver/ Kidney/Stomach slide (5-well)*
Ou
2. **504180.25** - 25 x *Rat Liver/ Kidney/Stomach slide (10-well)*

Autre matériel nécessaire non fourni

Eau distillée ou déionisée pour diluer le PBS II concentré

Un flacon pour contenir le PBS II dilué

Micropipettes pour le dépôt des échantillons

Chambre humide pour les étapes d'incubation

Microscope à fluorescence avec un filtre d'excitation à 495nm et un filtre d'émission à 515nm

Pissette pour les lavages au PBS II

Si seules les lames sont utilisées, les réactifs complémentaires peuvent être obtenus auprès de la société Inova Diagnostics : PBS II Concentrate (40x) (508998), IFA System Negative Control (508186), ANA Homogeneous Pattern (508101), Mitochondrial (AMA) Pattern (504052), Smooth Muscle (ASMA) Pattern (504053), FITC IgG (H&L) Conjugate (504021, 504072), 1% Evan's Blue (504049) et PVA Mounting Medium (504046, 504047).

Procédure

Contrôle de qualité

Les contrôles positifs et négatifs doivent être testés lors de chaque série.

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. **Diluer le PBS II concentré.** Diluer le PBS II dans de l'eau distillée ou déionisée (1 volume de PBS II pour 39 volumes d'eau) et mélanger. Une fois bouché, il peut être conservé un mois à 2-8°C. Le PBS II est utilisé pour diluer les échantillons et comme tampon de lavage.

3. **Dilution des échantillons.**
Pour le dépistage : diluer les échantillons au 1/20 (mettre 50µL de sérum dans 950µl de PBS II dilué).
Pour la titration : faire une gamme de dilution du sérum en PBS II (1/40, 1/80, 1/160, 1/320,...). Ex : Prendre 100µL de la dilution au 1/20 et ajouter 100µL de PBS II pour obtenir une dilution au 1/40. Continuer les dilutions en cascade pour obtenir les dilutions suivantes.
4. **Lames.** Les ramener à température ambiante (18-28°C) avant de les sortir de leur emballage. Les marquer puis les déposer dans la chambre humide avant le dépôt des contrôles positifs et négatifs (1 goutte) dans les puits 1 et 2. Déposer 50µL d'échantillons dilués dans les autres puits.
5. **Incubation des lames.** Incuber les lames pendant 20 minutes en chambre humide à température ambiante (18-28°C). (Des feuilles d'essuie-tout imbibées d'eau maintiendront le degré d'humidité nécessaire.)
6. **Lavage en PBS II.** Sortir les lames de la chambre humide et les rincer rapidement à l'aide d'une pissette contenant le tampon PBS II. Ne pas diriger le jet directement sur les puits. Mettre les lames sur un portoir et les immerger en PBS II sous agitation lente pendant 5 à 10 minutes.
7. **Conjugué fluorescent.** Eliminer l'excès de PBS II et sécher le pourtour des puits à l'aide des buvards fournis ou de papier absorbant. Remettre les lames en chambre humide et couvrir **immédiatement** chaque puits avec une goutte de conjugué fluorescent approprié. NE PAS LAISSER LES PUIITS A L'AIR PLUS DE 15 SECONDES. Le dessèchement des puits affecte le résultat.
8. **Incubation des lames.** Incuber les lames pendant 20 minutes en chambre humide à température ambiante (18-28°C). Recouvrir la chambre humide de papier pour éviter l'exposition à la lumière.
9. **Lavage en PBS II.** Procéder comme à la étape ci-dessus II est possible d'ajouter 2 à 3 gouttes de bleu d'Evans à 1% pour 100mL de PBS II avant l'immersion des lames. Ceci permettra une contre coloration.
10. **Montage des lames.** Les procédures de recouvrement varient d'un laboratoire à l'autre, mais la procédure suivante est recommandée pour le traitement manuel des lames :
 - Retirer une lame à la fois du lavage au PBS II. Sécher rapidement la zone entourant les puits et ajouter une goutte de préparation microscopique dans chaque puits. Abaisser lentement la lame sur la lamelle, en évitant la formation de bulles d'air. S'il y en a, ne pas tenter de les retirer. Essuyer l'excès de préparation du bord de la lamelle.
11. **Lecture des lames.** La lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence le plus rapidement possible.

Résultats

Contrôle de qualité

Le Homogène ANA Aspect doit présenter une fluorescence verte dans les noyaux des cellules. Le Mitochondrie (AMA) Aspect doit présenter une fluorescence verte des tubules rénaux et des cellules pariétales gastriques. Le Muscle Lisse (ASMA) Aspect doit présenter une fluorescence verte dans la couche musculaire de l'estomac. Le contrôle négatif peut présenter un très léger bruit de fond vert pâle sur toutes les coupes de tissu, mais en aucun cas une fluorescence franche. Si les puits de contrôle ne correspondent pas à la description ci-dessus, le test doit être considéré comme invalide et il est conseillé de le répéter.

Interprétation des résultats

Résultats négatifs

Le contrôle négatif peut présenter un très léger bruit de fond vert pâle sur toutes les coupes de tissu, mais en aucun cas une fluorescence franche. Les réactions faibles doivent être répétées mais à une concentration plus élevée (ex : 1/40). Si le nouveau test paraît identique au précédent, il est considéré comme négatif.

Résultats positifs

Un échantillon est considéré positif lorsqu'une fluorescence significative apparaît dans les organelles des tissus spécifiques donnant un des aspects suivants :

Anticorps anti-nucléaires (ANA)

Les ANA reconnaissent les noyaux des cellules du foie, les tubules distaux et proximaux du rein et les cellules gastriques pariétales et cellules principales. Presque tous les patients atteints de LED ont des ANA dans leur sérum mais les ANA peuvent aussi être trouvés dans différentes connectivites comprenant l'arthrite rhumatoïde. Les ANA peuvent être détectés également chez des patients atteints d'hépatite chronique en phase active et de cirrhose biliaire primitive ou en réponse à certains médicaments.

Des informations supplémentaires peuvent être obtenues par l'interprétation des aspects nucléaires des ANA (voir au-dessous). Il est recommandé de titrer tous les échantillons positifs. Il est également conseillé de rechercher les autoanticorps contre l'ADN double brin et les antigènes nucléaires solubles.

Aspect	Antigène impliqué	Maladie associée
Homogène	DNA double brin, histones	LED arthrite rhumatoïde (AR) Connectivites mixtes Lupus médicalement induit
Périphérique (Rim)	DNA natif, double brin	LED
Moucheté	ENA Ribonucléoprotéine, Scl-70, SSB	Sclérodémie Syndrome de Sjögren Connectivites mixtes LED
Nucléolaire	sRNA 4-6S	Sclérodémie Syndrome de Sjögren LED, AR et Sclérose systémique progressive

Apect du marquage pour les autoanticorps spécifiques des tissus:

Autoanticorps	Tissus associés	Principales maladies associées
Autoanticorps anti mitochondries (AMA)	Tubules distaux des reins et tubules proximaux (moins) Cytoplasme des hépatocytes (foie) et cytoplasme des cellules pariétales (estomac)	Cirrhoses biliaires primitive et autres pathologies du foie
Autoanticorps anti muscle lisse (ASMA)	Couche musculaire (estomac) Couche musculaire des artérioles (autres tissus)	Hépatites chroniques actives
Autoanticorps anti cellules gastriques pariétales (AGPCA)	Cellules pariétales (estomac)	Anémie pernicieuse
Autoanticorps anti réticuline (ARA)	Fibres péritubulaires Capsules de Bowman (rein) Membranes des cellules hépatiques, parois sinusoidales (foie)	Maladie de Crohn Maladie coeliaque Dermatoses herpétiques

Note : Chaque laboratoire doit établir son seuil de positivité clinique.

Limites du test

- 1. 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 de l’histoire clinique du patient.
- 2. Les aspects du marquage changent souvent lorsqu’un échantillon est titré jusqu’ à son point final. Ceci est dû à la présence de plusieurs autoanticorps, spécialement pour les ANA.
- 3. Un résultat négatif avec ce coffret peut être dû à une rémission ou à la présence d’autoanticorps non détectables avec cette technique.
- 4. La qualité des filtres, des optiques et de la source lumineuse peut influencer la sensibilité du test.
- 5. Les autoanticorps peuvent être activés ou induits par un grand nombre de médicaments tels que les contraceptifs oraux ou les antibiotiques.
- 6. Compte tenu du faible espacement entre les puits sur les lames de 10 puits, il est possible qu’il y ait des contaminations. La plus grande attention est recommandée lors des étapes de lavage.
- 7. Aucun test n’a été fait avec les réactifs provenant d’autres fournisseurs, mais leur utilisation n’est pas exclue.

Les lames vendues séparément sont classées comme « réactifs spécifiques d'analyte ».
Les caractéristiques analytiques et de performances ne sont pas établies, sauf comme élément de la trousse.

Valeurs Attendues et Performances
Valeurs attendues

Valeurs normales

Autoanticorps	Pourcentage d’apparition	Références
ANA	0-2	2
AMA	0-8	7
ASMA	3	2
ARA	5	8
AGPCA	10-15 (chez les personnes âgées)	9

Valeurs anormales

	Diagnostic clinique	Pourcentage d’apparition	Références
ANA	LED	99	4
	Connectivites mixtes	90	3
	Autre maladies auto immunes (AR, sclérodermie, syndrome de Sjögren, dermatomyosite)	15-50	3, 5
AMA	Cirrhose biliaire primitive	>95	3
ASMA	Hépatite chronique	70	3
	Cirrhose biliaire primitive	50	3
ARA	Maladie de Crohn	24	6
	Maladie coeliaque	38-50	3, 6
	Dermatose herpétique	22	6
AGPCA	Anémie pernicieuse	90	9

Etude comparative












Une étude comparative a été faite sur 96 échantillons cliniques en utilisant ce coffret et une méthode de référence commercialement disponible. 93 échantillons sur 96 ont donné des résultats identiques par les deux méthodes. Pour les aspects décrits dans le paragraphe résultats, la sensibilité relative était de 89-100%, la spécificité relative était de 100% dans chaque cas et les valeurs acceptables étaient de 93-100%. Pour les 3 cas qui diffèrent, un marquage ANA positif faible a été obtenu uniquement avec la méthode de référence, suggérant que ces échantillons sont limites pour cet aspect particulier et/ou qu'il y a de petites différences de sensibilité entre les deux méthodes.

Résumé de la procédure

1. Placer le milieu de montage à température ambiante.
2. Diluer le PBS II en eau distillée ou déionisée.
3. Diluer le sérum des patients au 1/20 en PBS II.
4. Ramener les lames à température ambiante (18-28°C).
5. Déposer 50µL des contrôles positifs et négatifs et des sérums de patients correctement dilués dans les puits appropriés.
6. Incuber dans une chambre humide pendant 20 minutes.
7. Laver pendant 5 à 10 minutes en PBS II.
8. Sécher le pourtour des puits et recouvrir immédiatement chaque puits d'une goutte de conjugué.
9. Incuber comme en 6.
10. Laver comme en 7.
11. Monter les lames.
12. Observation sous microscope à fluorescence.

NOVA Lite, Inova et Inova Diagnostics sont des marques d'Inova Diagnostics, Inc. © 2018 Inova Diagnostics, Inc. Tous droits réservés.

Symboles utilises

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Conformité aux normes européennes
	Représentant européen agréé
	Sur ordonnance uniquement, conformément aux dispositions de la FDA.
	Limite de température
	Code du lot
	Numéro de catalogue ou référence
	Fabricant
	Date de péremption
	Contenu suffisant pour
	Consulter les instructions d'utilisation.

Références

1. Tan E M (1989). Antinuclear Antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv. Immunol. **44**, 93-151.
2. Doniach, D, et al. (1986). Tissue antibodies in primary biliary cirrhosis, active chronic (lupoid) hepatitis, cryptogenic cirrhosis and other liver diseases and their clinical implications. Clin. Exp. Imm **1**: 237-262.
3. Wallington, T B & Gooi H C (1990). Clinical Immunology. A practical approach. Ed. Gooi, H C & Chapel, H. Publ. IRL Press, Oxford UK. 195-220.
4. Cavallaro, J J, et al (1976). Immunofluorescent detection of autoimmune diseases, Immunology Series No. 7. CDC, Atlanta, GA.
5. Seah, P P et al (1971). Antireticulin antibody: Tissue autoantibodies in dermatitis herpetiformis and adult coeliac disease. Lancet **1**, 834-836.
6. Seah, P P et al (1973). Antireticulin antibody: Incidence and diagnostic significance. Gut **14**, 311-315.
7. Goudie, R B et al (1966). Serological and histological diagnosis of primary biliary cirrhosis. J. Clin. Path, **19**, 527-538.
8. Rizzeto, M & Doniach, D (1973). Types of reticulin antibodies detected in human sera by immunofluorescence. J. Clin. Path. **26**, 841-851.
9. Bird, A G (1990). Clinical Immunology. A practical approach. Ed. Gooi, H C & Chapel, H. Publ. IRL Press, Oxford, UK. Pg.175-194.
10. Weller, TH, Coons, AH (1954). Fluorescent antibody studies with agents of Varicella and Herpes zoster propagated in vitro. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. **86**, 789 – 794.
11. 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 (U.S. & Canada Only) : 877-829-4745
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

624170FR

Juin 2018
Revision 6

