

Application

Le kit NOVA Lite IgG F-Actin est un test indirect par immunofluorescence (IFA) réalisé sur un substrat épithélial d'intestin de rat pour le dépistage et la détermination semi-quantitative des anticorps IgG anti-actine F dans du sérum humain. La présence d'anticorps IgG anti-actine F peut être utilisée conjointement à des résultats cliniques et d'autres tests de laboratoire pour faciliter le diagnostic de pathologies du foie auto-immunes, telles que l'hépatite chronique active auto-immune et la cirrhose biliaire primitive.

Résumé et explication du test

Les auto-anticorps IgG anti-actine F forment le principal composant de ce que l'on a appelé les anticorps anti-muscle lisse.¹⁻⁶ Leur présence peut atteindre 80 % chez les patients souffrant d'une hépatite chronique active auto-immune et 30 % chez les patients atteints d'une cirrhose biliaire primitive.^{2,6} Ces anticorps peuvent également être présents chez les individus ne souffrant pas d'hépatite chronique active auto-immune (généralement, avec des titrages faibles). Les anticorps anti-muscle lisse sont hétérogènes et comprennent les anticorps dirigés contre les formes filamenteuse (F) et globulaire (G) de l'actine, ainsi que vers des composants ne provenant pas de l'actine (par ex. la tubuline et les filaments intermédiaires).^{3,4,7} Plusieurs auto-anticorps sont associés à l'hépatite chronique active auto-immune. Cependant, les anticorps IgG anti-actine F sont les auto-anticorps les plus spécifiques de l'hépatite chronique active auto-immune.^{2,5}

Bien que les tests IgG F-Actin ELISA, notamment QUANTA Lite Actin IgG ELISA, permettent de détecter des anticorps IgG anti-actine F de manière objective et quantifiable, certains laboratoires préfèrent la méthodologie IFA pour dépister les anticorps IgG anti-actine F ou confirmer leur présence lorsqu'ils sont détectés par les sections de tissu de rein/estomac/foie de rongeurs classiques. Il est souvent difficile de différencier les anticorps anti-actine F d'autres anticorps dirigés contre les composants du muscle lisse à l'aide de substrats IFA classiques, tels que les sections de tissu de rein/estomac/foie.^{2,5} L'identification des anticorps anti-actine F offre une aide précieuse au diagnostic de l'hépatite chronique active auto-immune. Pour l'instant, il n'existe aucune méthode « idéale » pour discriminer les anticorps anti-actine F d'autres réactifs.^{1,2} Les plaques composées de cellules épithéliales d'intestin de rat et préparées selon des méthodes exclusives de croissance et de fixation offrent un nouveau substrat de détection des anticorps IgG anti-actine F par IFA. Ce substrat pallie certaines limites d'autres procédures IFA dans la mesure où le modèle d'anticorps IgG anti-actine F est distinct et que les autres anticorps, qui produisent un modèle d'interférence sur les lames de rein/estomac/foie, n'interfèrent pas sur le substrat de cellule épithéliale de rat.

Principes du test

Selon la technique indirecte par immunofluorescence, les échantillons sont mis à incuber avec le substrat d'antigène avant que les anticorps non liés ne soient lavés. Le substrat est ensuite mis à incuber avec un conjugué spécifique marqué à la fluorescéine, suivi d'un lavage pour éliminer le réactif non lié. Vus sous un microscope à fluorescence, les échantillons affichent une fluorescence vert pomme en correspondance des zones où l'auto-anticorps s'est lié. Un échantillon est considéré comme positif si une coloration spécifique, parfois observée dans les fibres traversant les cellules, est relevée dans les fibres d'actine F entourant la plupart des cellules selon un modèle hexagonal.

Réactifs

1. F-Actin Slide ; 6 puits/plaque, avec dessicatif
2. FITC IgG Conjugate, 1 flacon de (chèvre) marqué à la fluorescéine dans un tampon contenant du Bleu d'Evans et de l'azoture de sodium à 0,09 %
3. IgG F-Actin Positive Control, 1 flacon de tampon contenant de l'azoture de sodium à 0,09 % et des anticorps anti-actine F dans du sérum humain, prédilué
4. IFA System Negative Control, 1 flacon de tampon contenant de l'azoture de sodium à 0,09 % et des anticorps anti-actine F sans sérum humain, prédilué
5. PBS Concentrate (40x), 2 flacons
6. Mounting Medium, 1 flacon de azoture de sodium à 0,09 %
7. Coverslips

Avertissements

1. Toutes les substances d'origine humaine utilisées pour préparer les contrôles de ce produit ont été testées et se sont avérées négatives aux anticorps anti-VIH, HBsAg et VHC par des méthodes approuvées par la FDA. Aucune méthode de test ne peut toutefois garantir que le VIH, le VHB et le VHC ou d'autres agents infectieux sont absents. Le contrôle positif d'IgG anti-actine F et le contrôle négatif du système IFA doivent donc être manipulés de la même manière qu'une substance potentiellement infectieuse.⁸
2. L'azoture de sodium sert de conservateur. Cette substance est un poison qui peut réagir avec le plomb de sorte à former des azotures métalliques potentiellement explosifs. Rincer les éviers utilisés pour évacuer de gros volumes de réactif. Substance toxique par ingestion ou absorption à travers la peau ou les yeux. L'azoture de sodium peut réagir avec de l'eau contenant du plomb ou du cuivre : prévenir l'accumulation d'azoture.
3. Utiliser un équipement de protection personnelle approprié pour travailler avec les réactifs fournis.
4. Nettoyer immédiatement tout déversement de réactifs. Respecter toutes les législations nationales et locales relatives à l'élimination des déchets.

Précautions

1. Ce produit est à usage diagnostique *in vitro*.
2. La substitution par des composants autres que ceux fournis dans ce kit peut entraîner une incohérence des résultats.
3. Un lavage incomplet ou inefficace des puits d'IFA peut entraîner un bruit de fond élevé.
4. L'adaptation de ce test pour une utilisation en tout ou partie avec des passeurs d'échantillons automatiques et 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.
5. Divers facteurs influent sur les performances du test, notamment la température de départ des réactifs, l'intensité de l'ampoule du microscope utilisé, la précision et la reproductibilité de la technique de pipetage, le soin apporté au lavage et les durées d'incubation pendant le test. Prêter une attention particulière à la cohérence pour obtenir des résultats précis et reproductibles.
6. Il est recommandé de respecter strictement le protocole.

Conditions de conservation

1. Conserver tous les réactifs du kit entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions.
2. Le tampon de PBS dilué est stable pendant 4 semaines entre 2 et 8 °C.

Prélèvement des échantillons

Cette procédure doit être réalisée dans un échantillon de sérum. L'ajout d'azoture ou d'autres conservateurs aux échantillons de test peut fausser les résultats. Les échantillons ayant subi une contamination microbienne et thermotraités, lipémiques, hémolysés grossièrement ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés.

Suite au prélèvement, le sérum doit être séparé du caillot. Le document H18-A3 du CLSI (NCCLS) recommande de conserver les échantillons dans les conditions suivantes : 1) Conserver les échantillons à température ambiante pendant 8 heures maximum. 2) Si le test n'est pas réalisé dans les 8 heures, réfrigérer l'échantillon entre 2 et 8 °C. 3) Si le test n'est pas réalisé dans les 48 heures ou si l'échantillon doit être transporté, le congeler à -20 °C ou moins. Les échantillons congelés doivent être bien mélangés après décongélation et avant le test.

Procédure

Matériels fournis

- | | |
|---|------------------------------------|
| 5 | F-Actin Slide (6 well) |
| 1 | 7mL FITC IgG Conjugate |
| 1 | 0,8mL IgG F-Actin Positive Control |
| 1 | 0,5mL IFA System Negative Control |
| 2 | 25mL PBS Concentrate (40x) |
| 1 | 7mL Mounting Medium |
| 1 | Boîte de 10 Coverslips |

Matériels supplémentaires requis mais non fournis

Micropipettes pouvant administrer un volume compris entre 15 et 1 000 µL
Eau distillée ou désionisée
Pissettes en plastique ou pipettes Pasteur
Chambre humide

Conteneur d'1 L (pour diluer le PBS)

Tube de Coplin

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

Méthode

Avant de commencer

1. Ramener tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20-26 °C).
2. **Diluer le concentré de PBS** : IMPORTANT : diluer le concentré de PBS selon un rapport 1:40 en ajoutant le contenu du flacon de concentré de PBS à 975 ml d'eau distillée ou désionisée et bien mélanger. Le tampon PBS sert à diluer les échantillons patients et de tampon de lavage. Le tampon dilué peut être conservé jusqu'à 4 semaines entre 2 et 8 °C.
3. **Diluer les échantillons patients** :
 - a. Dépistage initial : diluer les échantillons patients selon un rapport 1:40 de tampon PBS dilué (ajouter 50 µL de sérum dans 1,95 ml de tampon PBS).
 - b. Titration : réaliser des séries de 2 dilutions à partir de la dilution initiale de dépistage pour tous les échantillons positifs à l'aide du tampon PBS dilué (1:80, 1:160, 1:320... jusqu'à la fin).

Procédure de test

1. **Préparer les plaques de substrat** : laisser la plaque de substrat revenir à température ambiante avant de la retirer de son sachet. L'étiqueter avec un crayon et la placer dans une chambre humide adaptée. Ajouter 1 goutte (20-25 µL) de contrôle positif et négatif non dilué respectivement dans les puits 1 et 2. Ajouter 1 goutte (20-25 µL) d'échantillon patient dilué dans les autres puits.
2. **Incubation de la plaque** : mettre à incuber la plaque pendant 30 ± 5 minutes dans une chambre humide (une serviette en papier humide placée à plat au fond d'un conteneur en plastique ou en verre fermé maintiendra les conditions d'humidité qui conviennent). Ne pas laisser le substrat sécher pendant la procédure de test.
3. **Laver les plaques** : suite à l'incubation, utiliser une pissette en plastique ou une pipette pour laver doucement le sérum avec le tampon PBS dilué. Orienter la plaque et le flux de tampon PBS de manière à limiter le débordement d'échantillons entre les puits. Éviter de diriger le flux directement sur le puits pour ne pas endommager le substrat. Si nécessaire, placer les plaques dans un tube de Coplin contenant un tampon PBS dilué pendant 5 minutes au maximum.
4. **Ajout du conjugué fluorescent** : éliminer l'excès de tampon PBS. Replacer la plaque dans la chambre humide et couvrir **immédiatement** chaque puits avec une goutte de conjugué fluorescent. Laisser incuber les plaques pendant 30 ± 5 minutes supplémentaires.
5. **Laver les plaques** : répéter l'étape 3.
6. **Lamelle** : les procédures liées aux lamelles varient d'un laboratoire à l'autre. La procédure suivante est toutefois recommandée :
 - a. Placer une lamelle sur une serviette en papier.
 - b. Appliquer le support pour préparations microscopiques en ligne continue jusqu'au bord inférieur de la lamelle.
 - c. Éliminer l'excès de tampon PBS et effleurer le bord inférieur de la plaque, jusqu'au bord de la lamelle. Abaisser doucement la plaque sur la lamelle de sorte que le support pour préparations métalliques s'écoule vers le bord supérieur de la plaque, sans formation de bulle d'air, ni piège à air.

Contrôle de qualité

Le contrôle positif d'IgG anti-actine F et le contrôle négatif du système IFA doivent être analysés sur chaque plaque pour vérifier que tous les réactifs et procédures fonctionnent correctement. D'autres sérums de contrôle adaptés peuvent être préparés en aliquotant des échantillons de sérum humain poolés et en les conservant à ≤ -70 °C. Pour que les résultats de test soient considérés comme valides, tous les critères énumérés ci-dessous doivent être remplis. Si l'un d'eux ne l'est pas, les résultats de test doivent être considérés comme non valides et le test doit être recommencé.

1. Le contrôle positif d'anticorps IgG anti-actine F non dilué doit être $\geq 3+$.
2. Le contrôle négatif du système IFA doit être négatif.

Interprétation des résultats

Réaction négative : un échantillon est considéré comme négatif si l'intensité de la coloration spécifique décrite ci-dessous, dans la section « Réaction positive », est inférieure ou égale à celle du contrôle négatif du système IFA. Les échantillons peuvent afficher divers degrés de coloration spécifique ou de fond par rapport aux autres composants cellulaires, mais être négatifs aux anticorps IgG anti-actine F.

Réaction positive : un échantillon est considéré comme positif si une coloration spécifique dont l'intensité est supérieure à celle du contrôle négatif du système IFA est observée dans les fibres d'actine F entourant la plupart des cellules selon un modèle hexagonal et parfois observée dans les fibres traversant les cellules.

Déterminer le degré de fluorescence ou d'intensité selon les critères suivants :

- 4+ Fluorescence brillante vert pomme
- 3+ Fluorescence claire vert pomme
- 2+ Fluorescence positive pouvant être nettement distinguée
- 1+ Fluorescence spécifique minimale permettant de différencier nettement la coloration de l'actine F de la fluorescence de fond.

Interprétation du modèle : divers modèles de coloration nucléaire et/ou cytoplasmique peuvent apparaître selon les types et les quantités relatives d'auto-anticorps présents dans l'échantillon. Seul le modèle décrit précédemment, dans la section intitulée « Réaction positive », doit être considéré comme positif aux anticorps IgG anti-actine F. Tous les autres modèles doivent être considérés comme négatifs.

Limites du test

- 1. Un modèle d'IgG anti-actine F fortement titré suggère une hépatite chronique active auto-immune, mais ne doit pas être considéré comme un diagnostic. Le résultat du test d'IgG anti-actine F doit être associé à d'autres résultats de laboratoire, ainsi qu'à l'ensemble du tableau clinique du patient.
- 2. Divers facteurs externes influent sur la sensibilité du test, notamment le type de microscope à fluorescence utilisé, l'intensité de l'ampoule et son ancienneté, l'agrandissement utilisé, le système de filtre et l'observateur.
- 3. Si un filtre à bande passante est utilisé au lieu d'un filtre d'arrêt à 515 nm, une coloration artificiellement accrue peut être observée.
- 4. Utiliser uniquement un crayon pour étiqueter les plaques. L'utilisation de tout autre moyen d'écriture peut provoquer une coloration artificielle.
- 5. Tous les tubes de Coplin utilisés pour laver les plaques doivent être exempts de tous résidus de colorant car cela pourrait provoquer une coloration artificielle.
- 6. Les caractéristiques de performances du test ont été établies pour le sérum, mais pas pour le plasma, ni pour d'autres types d'échantillons.

Valeurs attendues

La capacité du kit NOVA Lite IgG F-Actin à détecter des anticorps IgG anti-actine F a été déterminée par comparaison avec le test QUANTA Lite Actin IgG ELISA (Inova Diagnostics, Inc) disponible dans le commerce. Les résultats ELISA ont été déterminés comme positifs si l'échantillon patient présentait 20 unités ou plus et négatifs s'il en présentait moins de 20.

Plage normale

Quatre-cent quatre-vingt-treize échantillons issus de donneurs de sang sains ont été analysés à l'aide du kit NOVA Lite IgG F-Actin. Tous sauf 4 des 493 échantillons sains (99,2 % de spécificité) étaient négatifs sur NOVA Lite IgG F-Actin.

Comparaison entre NOVA Lite IgG F-Actin IFA et QUANTA Lite Actin IgG ELISA












Pour déterminer la concordance de positifs et négatifs des tests (en pourcentage), 992 échantillons contenant des anticorps dirigés contre une grande diversité d'antigènes ont été testés avec le kit NOVA Lite IgG F-Actin IFA et le test QUANTA Lite Actin IgG ELISA. Ces échantillons incluaient 493 donneurs de sang sains, 60 patients présentant des pathologies identifiées cliniquement (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé et sclérodermie), 40 échantillons contenant des anticorps définis (maladies infectieuses et auto-anticorps) et 399 échantillons de patients chez lesquels une pathologie du foie était suspectée.

N=992	QUANTA Lite Actin IgG ELISA Positif	QUANTA Lite Actin IgG ELISA Négatif	Total
NOVA Lite IgG F-Actin Positif	269	21**	290
NOVA Lite IgG F-Actin Négatif	69*	633	702
Total	338	654	992

Concordance de positifs en % 269/338 (80 %)
Concordance de négatifs en % 633/654 (97 %)
Concordance totale en % 902/992 (91 %)

* 39 des 69 échantillons sont faiblement positifs avec ELISA
** 14 des 21 échantillons étaient IFA 1+ (faible réactivité)

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 <n> Tests
	Consulter les instructions d'utilisation.

Referencias

1. Chretien-Leprince P, Ballot E, Andre C, et al. Diagnostic value of anti-F-actin antibodies in a French multicenter study. Ann NY Acad Sci 1050: 266-273, 2005.
2. Villalta D, Bizzaro N, Da Re M, et al. Diagnostic accuracy of four different immunological methods for the detection of anti-F-actin autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis and other liver related disorders. Autoimmunity 41: 105-110, 2008.
3. Czaja A, Norman G: Autoantibodies in the diagnosis and management of liver disease. J Clin Gastroenterol 37: 315-329, 2003.
4. Toh BH. Smooth muscle autoantibodies and autoantigens. Clin exp Immunol 38: 621-628, 1979.
5. Fusconi M, Cassani F, Zauli D, et al. Anti-actin antibodies: a new test for an old problem. Journal of Immunological Methods 130: 1-8, 1990.
6. Granito A, Muratori L, Muratori P, et al. Antibodies to filamentous actin (F-actin) in type 1 autoimmune hepatitis. J Clin Path 59: 280-284, 2006.
7. Dighiero G, Lymberi P, Monot C. Sera with high levels of anti-smooth muscle and anti-mitochondrial antibodies frequently bind to cytoskeleton proteins. Clin exp Immunol 82: 52-56, 1990.
8. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control/National Institute of Health, 2007, Fifth Edition.

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.) : 00+ 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

628255FR

Février 2019
Révision 2

