



SYSTÈME DE TEST ANA FLUORESCENT

Pour utilisation diagnostique in vitro

Pour l'Usage Professionnel

UTILISATION PRÉVUE: Il s'agit d'un test d'immunofluorescence indirecte pour la détection semi-quantitative des anticorps anti-nucléaires dans le sérum humain. Ce système de test doit être utilisé comme une aide à la détection des anticorps associés aux maladies rhumatismales systémiques.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Anticorps anti-nucléaire (ANA) est un terme général utilisé pour décrire les auto-anticorps dirigés contre diverses protéines nucléaires. Les premières études portant sur ces auto-anticorps, à l'aide de techniques d'immunofluorescence, ont révélé quelques spécificités des protéines nucléaires (1). La corrélation entre la positivité des tests ANA et le lupus érythémateux disséminé (LED) étant très élevée, un test ANA négatif exclut, de fait, cette maladie (2).

Bien que la présence d'anticorps anti-ADN constitue toujours une forte présomption de LED (3), un certain nombre de macromolécules nucléaires (4) et cytoplasmiques (5-7) ont également été détectées et associées à d'autres collagénoses (8-10). Certains de ces anticorps ont une valeur diagnostique et/ou pronostique, notamment en cas de sclérodémie généralisée évolutive (11-12), de connectivité mixte (13-15), de syndrome de Sjögren (16-17), de polymyosite (18) et/ou de polyarthrite rhumatoïde (19). En raison de ces associations cliniques, les tests ANA sont maintenant reconnus comme un outil d'analyse général de la collagénose (20).

La sensibilité des tests ANA varie en fonction du type de substrat utilisé, de la méthode de fixation et du type d'ANA présent dans le sérum. Les milieux de culture cellulaire sont généralement plus sensibles que les coupes de tissu (21-24).

Le système de test ANA d'Immuno Concepts, qui utilise des cellules épithélioïdes humaines présentant de nombreuses figures mitotiques* (HEp-2), est un système d'immunofluorescence de pointe pour la détection des ANA. Les cellules HEp-2 avec figures mitotiques ont montré une sensibilité plus élevée et une identification plus précise des divers motifs observables que le substrat de rein de souris classique pour la détection des anticorps dans la sclérodémie généralisée (25). Les figures mitotiques aident à la différenciation des motifs mais permettent également la détection d'antigènes nucléaires non signalés précédemment et présents à des concentrations plus élevées dans des cellules en phase active de mitose (26-28).

PRINCIPE DU TEST

Le système de test ANA fluorescent d'Immuno Concepts utilise la technique d'immunofluorescence indirecte initialement décrite par Weller et Coons (29). Les échantillons des patients sont mis à incuber avec le substrat antigénique afin de permettre la liaison spécifique des auto-anticorps aux noyaux cellulaires. En présence d'ANA, un complexe antigène-anticorps stable se forme.

**Mitose est un terme utilisé pour décrire le processus de division cellulaire. Elle comprend généralement six phases: interphase, prophase, métaphase, anaphase, télophase et cytokinèse.*

Après le rinçage destiné à éliminer les anticorps non liés spécifiquement, le substrat est mis à incuber avec un réactif d'anticorps anti-humain conjugué à de la fluorescéine. Lorsque les résultats sont positifs, on observe la formation d'un complexe tripartite stable composé d'un anticorps fluorescent lié à un anticorps anti-nucléaire humain, lui-même lié à un antigène nucléaire. Ce complexe peut être visualisé à l'aide d'un microscope à fluorescence. Dans les échantillons positifs, les noyaux des cellules présenteront une fluorescence vert pomme et une répartition particulière des antigènes nucléaires dans les cellules. Si l'échantillon est négatif pour l'ANA, le noyau ne présentera pas de répartition nucléaire claire.

COMPOSITION DES SYSTÈMES - MATÉRIELS FOURNIS

Utilisation: Tous les composants sont prêts à l'emploi et ne requièrent ni aliquotage ni reconstitution (sauf pour le tampon PBS qui doit être dissous dans une eau désionisée ou distillée avant utilisation).

Conservation: Tous les composants doivent être conservés au réfrigérateur entre 2 et 10°C. Après reconstitution, le tampon PBS doit être conservé dans des récipients à bouchon à vis, et conserver entre 2 et 25°C.

Stabilité: Tous les composants sont stables pendant 12 mois à partir de la date de fabrication. Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.

RÉACTIFS

Lames de substrat **SLIDE:** Lames de substrat ANA utilisant des cellules HEp-2 (avec figures mitotiques) dont la culture et la stabilisation sont directement effectuées sur les puits de test. Le concept unique de lame recouverte de téflon (Moat) évite toute contamination croisée entre les puits pendant le test. Le sachet de la lame contient un gaz inerte non toxique qui contribue à la stabilité des cellules.

Contrôle positif homogène **CONTROL|+:** Réf. catalogue 2021. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain positif riche en anticorps spécifiques aux antigènes nucléaires ADN et/ou DNP. On observe une coloration homogène du sérum sur le substrat de cellules HEp-2 d'Immuno Concepts, que l'on retrouve dans la région chromosomique des cellules mitotiques.

Contrôle positif moucheté **CONTROL|+:** Réf. catalogue 2022. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain positif riche en anticorps spécifiques aux antigènes nucléaires Sm et/ou RNP. Ce sérum présente l'une des fluorescences mouchetées les plus courantes observées sur le substrat de cellules HEp-2 d'Immuno Concepts. On note une fluorescence négative dans la région chromosomique des cellules mitotiques.

Contrôle positif nucléolaire **CONTROL|+:** Réf. catalogue 2023. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain positif riche en anticorps spécifiques aux antigènes nucléolaires. Ce sérum présente une fluorescence nucléolaire sur le substrat de cellules HEp-2 d'Immuno Concepts.

Contrôle positif centromérique **CONTROL|+:** Réf. catalogue 2025. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain positif riche en anticorps spécifiques aux centromères chromosomiques (kinétochore). Ce sérum présente une fluorescence mouchetée discrète sur le substrat de cellules HEp-2 d'Immuno Concepts, que l'on retrouve dans la région chromosomique des cellules mitotiques.

Sérum de contrôle titrable **TC:** Réf. catalogue 2026. Flacon prêt à l'emploi contenant 0,5 ml de sérum de contrôle humain positif, qui doit être traité comme un échantillon patient pur (non dilué). Voir l'étiquette du flacon pour connaître le titre.

Sérum de contrôle négative **CONTROL|-:** Réf. catalogue 2031. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain négatif. Bien que le sérum de contrôle négatif puisse présenter une faible fluorescence du cytoplasme et une fluorescence plus vive de la région non chromosomique de la cellule mitotique, on n'observe aucune fluorescence nucléaire.

Réactif immunofluorescent **CONJ|FITC:** Réf. catalogue 2009 (9,0 ml), 2075 (23 ml), 2009CS (9,0 ml), 2075CS (23 ml), 2009B (9,0 ml), 2075B (23 ml). Anti-IgG humaine conjuguée à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Les kits de test complets comprennent des flacons compte-gouttes de précision prêts à l'emploi. Chaque flacon contient 9,0 ml de réactif, soit la quantité suffisante pour 10 lames.

COMPOSANTS NON RÉACTIFS

Poudre tampon PBS **PWDR|PBS**: Réf. catalogue 1011. Solution saline en poudre tamponnée au phosphate (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Chaque sachet contient une quantité suffisante de poudre tampon pour préparer 1 litre de solution. (Chaque kit de test complet contient un sachet de poudre tampon pour cinq lames.)

Préparation: Dissoudre un sachet de poudre tampon dans 1 litre d'eau désionisée ou distillée, couvrir puis conserver entre 2 et 25°C pendant quatre semaines maximum ou jusqu'à ce que des signes de contamination ou de modifications visibles apparaissent.

Milieu de montage semi-permanent **SOLN|MM**: Réf. catalogue 1111. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 5,0 ml de milieu de montage à base de glycérol.

Lamelles couvre-objet **CVSLP**: Réf. catalogue 1042. Chaque paquet contient dix lamelles couvre-objet en verre n°1 de 24 x 64 mm.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE REQUIS - MAIS NON FOURNI

Pipettes volumétriques permettant de prélever 20 à 25 µl
Jarres Coplin ou cuves à coloration
Pissette en plastique ou pipettes Pasteur
Pipettes sérologiques
Récipients d'un litre (pour tampon PBS)
Eau désionisée ou distillée
Tubes à essai pour préparer les dilutions de sérum
Papier absorbant ou serviettes en papier
Chambre d'incubation
Gants jetables
Chronomètre de laboratoire
Microscope à fluorescence équipé d'un filtre d'excitation de 495 nm et d'un filtre d'émission de 515 nm

PRÉCAUTIONS

1. Tous les matériels d'origine humaine utilisés dans la composition de ce produit ont été testés et se sont révélés négatifs (non-réactivité répétée) vis-à-vis des anticorps des virus de l'immunodéficience humaine 1 et 2 (VIH 1 et 2), de l'anticorps du virus de l'hépatite C (HCV) et de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg), selon les méthodes approuvées par la FDA. Néanmoins, aucune méthode de test ne peut assurer totalement l'absence de VIH-1, VIH-2, HCV, HBV ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, tous les matériels du kit doivent être manipulés de la même manière que des matériels considérés comme potentiellement infectieux.
2. Tous les échantillons de patient doivent être manipulés conformément aux recommandations du niveau de biosécurité 2 comme pour tout échantillon de sérum ou de sang humain potentiellement infectieux, telles qu'indiquées dans le manuel du Centers for Disease Control/National Institutes of Health: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La dilution des composants ou l'utilisation de composants autres que ceux fournis dans ce kit peut donner lieu à des résultats incohérents.
4. L'azide de sodium (0,09%) est utilisé comme conservateur. Il est possible que l'azide de sodium réagisse au contact des canalisations en plomb ou en cuivre et forme des sels d'azides métalliques explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer abondamment les canalisations avec de l'eau afin d'éviter toute accumulation de résidus. L'azide de sodium est un poison et peut être toxique en cas d'ingestion.
5. Ce kit est destiné à une utilisation diagnostique *in vitro*.
6. En cas d'utilisation de sérums hémolysés ou lipémiques, il est conseillé de procéder à une inactivation de 30 minutes à 56°C pour obtenir des résultats optimaux. Ne pas utiliser les sérums contaminés d'un point de vue microbien.
7. Le sérum de contrôle titrable est destiné à être utilisé pour surveiller la reproductibilité inter-lot et inter-analyse. Il n'est pas destiné à mesurer la sensibilité ou la spécificité globale du dosage.
8. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
9. Éviter toute éclaboussure ou pulvérisation d'aérosols à tout moment.
10. Les durées et températures d'incubation autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés.
11. La contamination croisée des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.

12. Avant utilisation, la verrerie réutilisable doit être lavée et rincée soigneusement afin d'éliminer tout détergent. Toute la verrerie doit être propre et sèche avant utilisation.
13. Avant utilisation, porter les réactifs, lames et échantillons à température ambiante (18-25°C).
14. Mettre des gants jetables pour manipuler les échantillons et les réactifs puis se laver soigneusement les mains en fin de procédure technique.
15. La contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
16. Ne pas pipeter avec la bouche et éviter tout contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs et les échantillons. En cas de contact, laver abondamment avec un savon germicide et de l'eau.

PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

Prélèvement: Le sérum est l'échantillon préférentiel. Environ 5 ml de sang entier doivent être prélevés de manière aseptique par ponction veineuse à l'aide d'un tube à prélèvement sous vide stérile ou tout autre système de prélèvement adapté. Laisser le sang coaguler à température ambiante (18-25°C). Le sérum doit être séparé du caillot par centrifugation aussi rapidement que possible, de façon à limiter l'hémolyse.

Substances interférentes: Les sérums présentant un degré élevé d'hémolyse, d'ictère, de lipémie ou de prolifération microbienne doivent être écartés car ces anomalies peuvent engendrer des résultats aberrants. Les échantillons contenant des particules visibles doivent être clarifiés par centrifugation avant de procéder au test.

Conservation: Les sérums peuvent être conservés entre 2 et 10°C pendant une semaine maximum. Si le test est reporté, ils doivent être congelés à -20°C minimum. Le sérum ne doit pas être conservé dans un réfrigérateur ou un congélateur à dégivrage automatique.

ATTENTION: Les congélations et décongélations successives des échantillons de patient peuvent induire des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les contrôles positif, négatif et PSB doivent être testés une fois par essai. Le contrôle positif doit présenter une fluorescence vert pomme intense des noyaux des cellules, avec un motif clairement visible et caractéristique du sérum de contrôle utilisé. Le contrôle négatif doit présenter une fluorescence vert sombre non spécifique peu intense simultanée du cytoplasme et du noyau, mais sans motif fluorescent nucléaire visible. Le contrôle PBS est utilisé pour observer la fluorescence non spécifique par le réactif anticorps et ne doit présenter aucune fluorescence verte. Si les contrôles n'apparaissent pas tel que décrit, le test n'est pas valable et doit être recommencé.

CONTRÔLE TITRABLE OPTIONNEL

Lors de la lecture des titres, de nombreux laboratoires commencent par lire le puits qui contient l'échantillon le plus dilué puis poursuivent « à rebours » jusqu'à la dilution 1:40. Le premier puits dans lequel une fluorescence nucléaire clairement perceptible est visible est le résultat du titrage. Nous recommandons cette technique pour la détermination des résultats du titrage.

Le titre moyen et la plage de titrage (\pm une dilution de part et d'autre de la moyenne) déterminés pour ce numéro de lot ont été établis dans notre laboratoire et sont communiqués à titre indicatif. Ce contrôle est fourni pour permettre à chaque laboratoire d'évaluer la reproductibilité (précision) de son test ANA. Étant donné que ce contrôle n'est pas destiné à être un indicateur de la précision du titrage, chaque laboratoire doit établir sa propre référence de titrage moyen pour cet échantillon et utiliser cette information pour évaluer la reproductibilité inter-analyse (précision).

Par de multiples dosages de ce contrôle titrable réalisés à l'aide du système de test ANA fluorescent d'Immuno Concepts, une valeur de titre moyen a été établie pour chaque numéro de lot. Le numéro de lot, le titre moyen et la plage de titrage (\pm une double dilution de part et d'autre de la moyenne) sont indiqués sur l'étiquette du flacon et doivent être utilisés à titre indicatif.

Il est important de ne pas confondre intensité de la fluorescence et présence ou absence d'anticorps anti-nucléaires. Le facteur clé à prendre en compte dans la détermination de la positivité d'une dilution de sérum donnée est l'apparition d'un motif clairement visible, indépendamment de l'intensité de la fluorescence.

Ce contrôle titrable présentera l'image mouchetée typique associée aux anticorps RNP. On peut également observer une seconde répartition de NSp I (plusieurs mouchetures discrètes dans le noyau des cellules en interphase), mais c'est l'image mouchetée RNP classique qui doit être utilisée pour la lecture du résultat.

Les valeurs obtenues dans notre laboratoire peuvent différer de vos propres valeurs. De nombreux facteurs peuvent affecter vos résultats, notamment les éléments suivants:

1. Type de source lumineuse utilisé. Les sources de lumière au mercure généreront une plus grande énergie d'excitation à 495 nm que le quartz/l'halogène. Les sources de lumière au mercure 50 watts, 100 watts et 200 watts diffèrent peu en matière d'énergie d'excitation à 495 nm. Les sources de lumière au quartz/l'halogène 100 watts produiront une plus grande énergie d'excitation à 495 nm que le quartz/l'halogène 50 watts.
2. État et âge de la source lumineuse. Cela est particulièrement vrai pour les sources de lumière au mercure qui affichent généralement une réduction progressive de l'énergie d'excitation à 495 nm avant de griller. Cette réduction progressive peut entraîner une perte de sensibilité significative au fil des semaines. Ce problème peut être résolu par la tenue d'un journal. Pour de meilleurs résultats, remplacer les ampoules au mercure de 50 watts toutes les 100 heures et les ampoules au mercure de 100 ou 200 watts toutes les 200 heures. Les sources de lumière au quartz/halogène n'affichent généralement pas de réduction progressive de l'énergie d'excitation avant de griller.
3. Type de filtre d'excitation utilisé. Les filtres d'excitation interférentiels offrent une plus grande sensibilité sur une longueur d'onde beaucoup plus étroite que les filtres d'excitation absorbants. Se reporter au manuel du microscope à fluorescence ou contacter le représentant pour plus d'informations.
4. Alignement correct de l'axe optique du microscope. Pour les instructions, se reporter au manuel du microscope à fluorescence.
5. Ouverture numérique de l'objectif. Grâce à la lumière incidente (Epi), la fluorescence augmente de manière exponentielle à mesure que l'ouverture numérique (ON) de l'objectif augmente. Cela peut conduire un objectif 40X avec une ON de 0,65 à lire une ou plusieurs dilutions inférieures à un objectif 40X avec une ON de 0,85. L'ouverture numérique est indiquée sur le côté de l'objectif.
6. Filtres de suppression. Les filtres de suppression réduisent les longueurs d'onde d'excitation spécifiques et peuvent être utilisés pour réduire la sensibilité. Se reporter au manuel du microscope à fluorescence ou contacter le représentant pour plus d'informations.
7. Précision et exactitude de la technique de dilution, de l'équipement et de la réalisation des procédures de test.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU PATIENT

Un grossissement total de 200X est recommandé pour le test positif/négatif tandis qu'un grossissement total de 400X est conseillé pour l'identification de divers motifs et la visualisation des cellules mitotiques.

Négatifs: Un sérum est considéré comme négatif aux anticorps anti-nucléaires lorsque la fluorescence des noyaux est inférieure ou égale à celle observée pour les puits du contrôle négatif sans motif clairement visible. Le cytoplasme peut présenter une légère fluorescence, avec une fluorescence plus vive de la région non chromosomique des cellules mitotiques, mais sans motif nucléaire clairement visible.

Positifs: Un échantillon de sérum est considéré comme positif lorsque le noyau présente un motif fluorescent clairement visible pour une majorité de cellules interphasiques.

Titres: Lors de la lecture des titres, de nombreux laboratoires commencent par lire le puits qui contient l'échantillon le plus dilué puis poursuivent « à rebours » jusqu'à la dilution 1:40. Le premier puits dans lequel une image clairement perceptible est visible constitue le résultat du titrage. Nous recommandons cette technique pour la détermination des résultats du titrage. Il est important de ne pas confondre intensité de la fluorescence et présence ou absence d'anticorps anti-nucléaires. Le facteur clé à prendre en compte dans la détermination de la positivité d'une dilution de sérum donnée est l'apparition d'un motif nucléaire clairement visible, indépendamment de l'intensité de la fluorescence.

ATTENTION: Certains sérums peuvent présenter une fluorescence nucléaire et cytoplasmique sans motif nucléaire apparent. Ce phénomène est généralement attribué aux anticorps hétérophiles et doit être considéré comme négatif (30).

INTENSITÉ DE LA FLUORESCENCE

L'intensité fluorescente peut être semi-quantifiée à l'aide des directives établies par le Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta (Georgie) pour les réactifs immunofluorescents.

- 4+ Jaune-vert intense (fluorescence maximale): contour net des cellules, centre de la cellule parfaitement défini.
- 3+ Fluorescence jaune-vert moins intense: contour net des cellules, centre de la cellule parfaitement défini.
- 2+ Image cellulaire nette mais faible fluorescence: contour des cellules moins bien défini.
- 1+ Fluorescence très voilée: dans la plupart des cas, le contour des cellules ne peut quasiment pas être distingué du centre.

Une lame standard pour la détermination de ces intensités fluorescentes, FITC QC Slide™, référence catalogue 1900, est disponible auprès d'Immuno Concepts, N.A. Ltd.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Test: Les résultats doivent être notés fortement positifs ou positifs à la dilution 1:40 et le motif fluorescent du noyau doit être communiqué.

Titrage: Les résultats doivent être communiqués comme la dernière des dilutions successives dans laquelle une fluorescence est clairement visible. Les résultats avec une forte réaction au niveau de dilution le plus élevé doivent être rapportés comme étant supérieurs à cette dilution. Les titres allant de 1:40 à 1:80 sont considérés comme des titres faibles, ceux de 1:160 à 1:320 comme moyens et ceux supérieurs ou égaux à 1:640 comme élevés. Il n'est pas nécessaire de déterminer le titre final. Un résultat de titrage ANA supérieur ou égal à 1:640 est considéré comme un titre élevé et alertera le clinicien d'effectuer des tests additionnels. Chaque laboratoire doit établir sa stratégie de dépistage, basé sur les anticorps détectés selon leur population de patients.

DÉTECTION DES MOTIFS

Homogène: Fluorescence uniforme du noyau avec ou sans effacement apparent des nucléoles. La région chromosomique des cellules mitotiques en métaphase est clairement positive avec une intensité de fluorescence lisse ou périphérique supérieure ou égale aux noyaux interphasiques.

Synonymes: Diffuse, uniforme.

Antigènes nucléaires: ADN double brin, ADNn, DNP, histone.

Associations cliniques: Les titres élevés suggèrent un LED. Les titres plus faibles suggèrent un LED ou d'autres collagénoses (31).

Périphérique: Fluorescence uniforme, principalement autour de la région extérieure du noyau, avec une fluorescence plus faible vers le centre du noyau. La région chromosomique des cellules mitotiques en métaphase est clairement positive avec une intensité de fluorescence lisse ou périphérique supérieure ou égale aux noyaux interphasiques.

Synonymes: Marginale, hérissée, membraneuse.

Antigènes nucléaires: ADN double brin, ADN simple brin, ADNn, DNP, histone.

Associations cliniques: Les titres élevés suggèrent un LED; les titres plus faibles suggèrent un LED ou d'autres collagénoses (31).

Mouchetée: Fluorescence granulaire fine ou grossière du noyau généralement sans coloration des nucléoles. La région non chromosomique des cellules mitotiques en métaphase présente une fluorescence, contrairement à la région chromosomique (négative).

Antigènes nucléaires: Sm, RNP, Scl-70, SSA/Ro, SSB/La et d'autres systèmes antigène-anticorps non encore caractérisés.

Associations cliniques: Les titres élevés suggèrent un LED (antigène Sm), une connectivité mixte (antigène RNP), une sclérodémie (antigène Scl-70) ou un syndrome de Goujerot-Sjögren (antigène SSA/Ro ou SSB/La). Les titres plus faibles peuvent suggérer d'autres collagénoses (32).

Nucléolaire: Large fluorescence mouchetée grossière dans le noyau, en général moins de 6 par cellule, avec ou sans fines mouchetures occasionnelles (entre 5 et 10). La région non chromosomique des cellules mitotiques en métaphase présente une forte fluorescence, contrairement à la région chromosomique (faible fluorescence). Les cellules en anaphase et télophase peuvent présenter une fluorescence similaire à celles des noyaux interphasiques.

Antigènes nucléaires: Généralement appelés ARN 4-6S et autres antigènes nucléaires tels que fibrillarine, ARN polymérase I, NOR 90 et PM/Scl.

Associations cliniques: Titres élevés prévalant dans la sclérodémie et le syndrome de Sjögren (33).

Centromérique: Image fluorescente mouchetée discrète suggérant fortement un syndrome CREST[§], variante de la sclérodémie (25). Les mouchetures nucléaires sont très discrètes et généralement par multiples de 46 (généralement 23-46 mouchetures par noyau). Les centromères étant des constriction où les fibres fusiformes s'attachent aux chromosomes, les cellules mitotiques présenteront la même réaction de moucheture dans la région chromosomique (12).

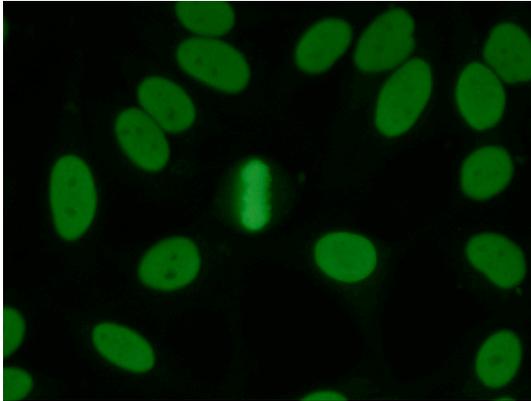
Synonymes: ACA, mouchetée discrète.

Antigènes nucléaires: Centromères chromosomiques (kinétochores).

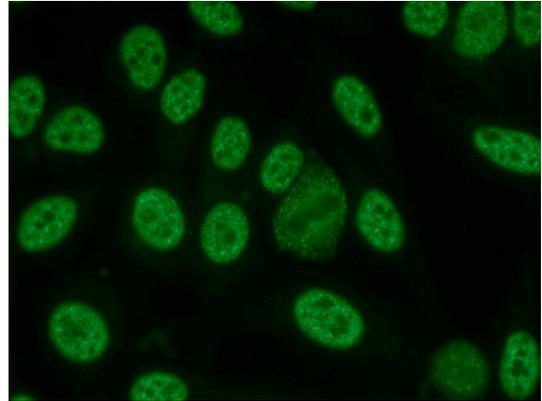
Associations cliniques: Suggère fortement un syndrome CREST, variante de la sclérodémie (25).

[§]CREST est une forme de sclérodémie avec calcinose marquée, syndrome de Raynaud, trouble fonctionnel de l'œsophage, sclérodactylie et tégangiectasie.

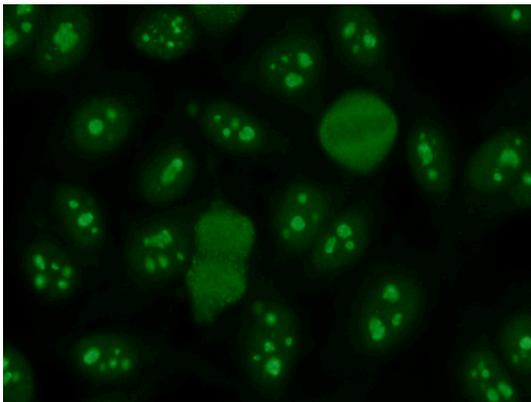
MOTIFS FLUORESCENTS DE BASE



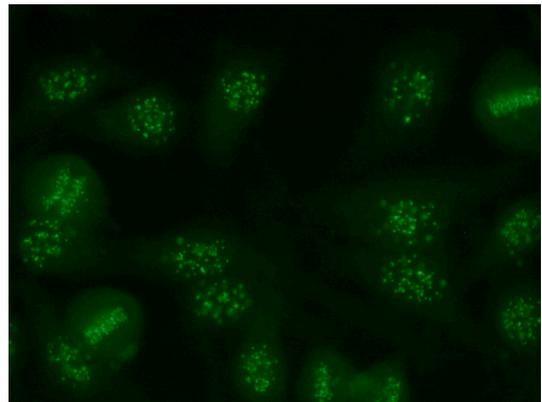
Homogène



Moucheté



Nucléolaire



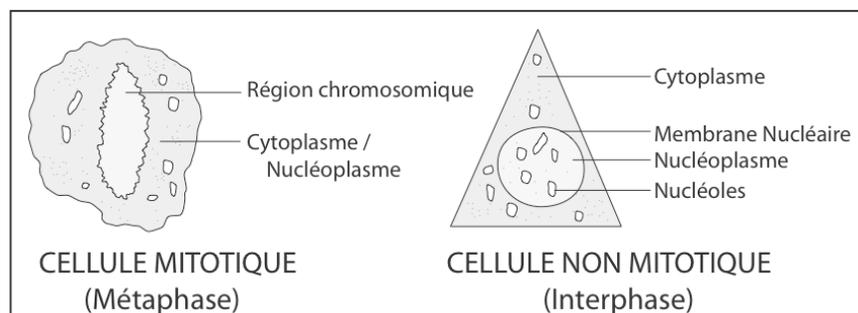
Centromérique

CELLULES MITOTIQUES

DÉTECTION

Les cellules mitotiques doivent être visibles sur chaque champ aux grossissements inférieurs ou égaux à 200X. Pour vérifier si une cellule est en mitose, utiliser un grossissement à 400X. Les cellules mitotiques présentent une forme cellulaire arrondie caractéristique sans membrane nucléaire détectable. La région chromosomique des cellules mitotiques présente généralement une forme irrégulière, due à l'absence de membrane nucléaire, ainsi qu'une constriction extrême des chromosomes.

Les sérums positifs aux anticorps anti-ADN et/ou DNP et/ou anti-histones (cas du contrôle positif homogène d'Immuno Concepts) présenteront une fluorescence intense de la région chromosomique de ces cellules. Dans les échantillons négatifs aux anticorps anti-ADN et/ou DNP et/ou anti-histones (cas du contrôle positif moucheté d'Immuno Concepts), les cellules mitotiques ne présenteront pas de fluorescence chromosomique et peuvent s'avérer difficiles à voir.



UTILISATION DES CELLULES MITOTIQUES

Distinction anticorps mouchetés/anticorps homogènes: Une image fluorescente finement mouchetée est parfois difficile à différencier d'une fluorescence homogène. Si le motif est homogène, la fluorescence des chromosomes des cellules mitotiques sera uniforme. Si l'image est parfaitement mouchetée, l'extérieur des chromosomes présentera une réaction finement mouchetée.

REMARQUE: Si la fine moucheture de la totalité de la cellule mitotique survient en même temps qu'une fluorescence uniforme de la région chromosomique, il est fort probable qu'au moins deux anticorps soient présents. noter/Noter la dilution de test comme étant mouchetée/homogène et titrer chaque anticorps pour obtenir un résultat.

Anticorps périphérique vs anticorps anti-membrane nucléaire: Les anticorps qui présentent un motif périphérique sont généralement associés à la présence d'antigènes nucléaires anti-ADN/DNP. Les titres élevés de ces anticorps suggèrent un LED. Dans les substrats qui ne contiennent pas de cellules mitotiques, il peut s'avérer difficile de distinguer le motif périphérique de l'anticorps anti-membrane nucléaire. Ces motifs peuvent être différenciés à l'aide des cellules en mitose d'Immuno Concepts car la région chromosomique des cellules mitotiques sera intensément colorée en cas de motif périphérique mais ne sera pas colorée par les anticorps anti-membrane nucléaire. Cette distinction est importante d'un point de vue clinique car l'anticorps anti-membrane nucléaire n'a pas de spécificité ADN/DNP et n'est pas associé au LED (34).

Anticorps anti-centromères (ACA) vs. anticorps mouchetés atypiques ressemblant au centromère: Afin de vérifier l'anticorps anti-centromère, la région chromosomique des cellules mitotiques doit être intensément colorée avec des mouchetures discrètes. Si la région chromosomique ne se colore pas, l'anticorps n'a pas de spécificité kinétochore ni d'association avec la variante CREST de la sclérodémie (35). Si la région chromosomique ne se colore pas, l'anticorps n'est pas anti-centromère et doit être noté comme étant « moucheté atypique ».

FLUORESCENCE CYTOPLASMIQUE

Bien que les auto-anticorps anti-antigènes cytoplasmiques soient rarement associés aux collagénoses, ils peuvent être détectés à l'aide de substrats de culture de cellules épithéliales (36). Les anticorps anti-mitochondries et anti-muscles lisses figurent parmi les deux types d'anticorps les plus détectés et sont généralement associés à une mononucléose infectieuse, à une hépatite chronique active et à diverses pathologies du foie (37-38). Des anticorps anti-muscles lisses ont également été décrits en utilisant un substrat de cellules HEp-2 chez des patients qui ont des verrues (39).

Anticorps anti-mitochondries (AMA): Mouchetures discrètes concentrées dans la région périnucléaire de la cellule et dispersées en densité plus faible vers les régions externes du cytoplasme. Cela doit être distingué de l'anticorps dirigé contre l'appareil de Golgi, qui ne colore généralement qu'un côté de la région périnucléaire, ainsi que de l'anticorps anti-ribosome, qui présente des mouchetures plus fines avec une apparence en forme de brin correspondant à l'emplacement du réticulum endoplasmique dans la cellule.

REMARQUE: Il est plus aisé de différencier les mouchetures périnucléaires de la fluorescence nucléaire périphérique du fait que les mouchetures mitochondriales forment une fluorescence mouchetée interrompue à l'extérieur de la membrane nucléaire, tandis que les sérums périphériques forment une fluorescence lisse uniforme à l'intérieur de la membrane nucléaire.

ENREGISTRER LES SÉRUMS COMME ÉTANT NÉGATIFS AUX ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES ET VÉRIFIER LA POSITIVITÉ AUX ANTICORPS ANTI-MITOCHONDRIES SUR SUBSTRAT SPÉCIFIQUE AUX AMA.

Anticorps anti-muscles lisses (ASMA): Fin réseau de très fines fibres fluorescentes traversant entièrement le cytoplasme. Contrairement aux anticorps anti-mitochondries, la fluorescence des anticorps anti-muscles lisses est uniforme sur la totalité du cytoplasme et peut également s'étendre sur le noyau. Dans les cellules mitotiques, on observe généralement de grosses mouchetures discrètes en dehors de la région chromosomique. Il a été démontré que les anticorps anti-muscles lisses comportaient une forte spécificité vis-à-vis de l'actine (40-41).

ENREGISTRER LES SÉRUMS COMME ÉTANT NÉGATIFS AUX ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES ET VÉRIFIER LA POSITIVITÉ AUX ANTICORPS ANTI-MUSCLES LISSES SUR SUBSTRAT SPÉCIFIQUE AUX ASMA.

LIMITES DU TEST

1. Le diagnostic ne peut pas être réalisé sur la base de la détection des anticorps anti-nucléaires seuls. Le médecin doit interpréter ces résultats au regard des antécédents et des symptômes du patient, des observations physiques et d'autres procédures de diagnostic.
2. Le traitement ne doit pas débuter sur la seule base d'un test positif aux anticorps anti-nucléaires. Les indications cliniques, les autres analyses de laboratoire et le diagnostic clinique du médecin doivent être pris en compte avant de commencer tout traitement.
3. Certains médicaments (procaïnamide, hydralazine...) peuvent provoquer des pathologies similaires au lupus érythémateux (42). Les patients souffrant de lupus érythémateux induit par des médicaments peuvent présenter des ANA homogènes ou homogènes/périphériques positifs généralement dirigés contre les histones nucléaires (43).
4. Il est possible que la méthode 'immunofluorescence indirecte ne détecte pas la présence d'ANA chez un faible pourcentage de patients souffrant de LED mais que celle-ci soit détectée par d'autres techniques (44).
5. Il n'est pas nécessaire de déterminer le titre final. Un résultat de titrage ANA supérieur ou égal à 1:640 est considéré comme un titre élevé et alertera le clinicien d'effectuer des tests additionnels. Chaque laboratoire doit établir sa stratégie de dépistage, basé sur les anticorps détectés selon leur population de patients. Bien qu'un ANA à titrage élevé fasse indéniablement penser à une collagénose, il ne doit pas être considéré comme un élément diagnostique mais plutôt comme faisant partie des antécédents cliniques d'un patient.
6. Les motifs fluorescents changent souvent au cours des titrages successifs des sérums. Ce phénomène est généralement dû à la présence de plusieurs anticorps anti-nucléaires.
7. En raison des nombreuses options disponibles sur les microscopes à fluorescence, il est recommandé que les sources de lumière, les filtres et les optiques soient normalisés lors de la comparaison des titres de patients entre plusieurs laboratoires.
8. On note la présence d'un certain nombre d'ANA positifs chez un faible pourcentage de patients développant des néoplasmes et/ou des infections (9).

VALEURS ESCOMPTÉES

Une étude, réalisée pendant 2 ans dans un grand centre hospitalier universitaire, a donné les résultats suivants sur substrat ANA de cellules HEp-2 (45). Tableau 1.

TABEAU 1

Diagnostic	Motif Ségrégation	% Positif
Population pathologique (plus de 4 500 échantillons de sérum testés):		
Lupus érythémateux disséminé	M, P+H, H, P	93
Polyarthrite rhumatoïde	M, H	40
Connectivité mixte (MCTD)	M	99
Sclérodermie généralisée évolutive-diffuse	M, N	85
Sclérodermie généralisée évolutive-CREST	ACA	93
Arthrite rhumatoïde juvénile		
Disséminée	M	14
Polyarticulaire	M	13
Pauciarticulaire-B27+	-	0
DM/PM	M	25
Vascularite	M	20
Population saine (plus de 9 000 échantillons de sérum testés):		
20-60 ans	M	2
70-80 ans	M	3,5

Abréviations: M=Moucheté, H=Homogène, P=Périphérique, N=Nucléolaire, ACA=anti-Centromère

PERFORMANCES

Le système de test ANA d'Immuno Concepts a été comparé à deux autres tests d'immunofluorescence disponibles sur le marché (45). L'étude a porté sur 97 échantillons de sérum provenant de sujets sains ainsi que de patients atteints de lupus érythémateux disséminé (LED), de connectivité mixte (MCTD), d'une variante Raynaud-sclérodémie généralisée évolutive-CREST (PSS-CREST), de polyarthrite rhumatoïde, d'arthrite rhumatoïde juvénile et d'autres collagénoses. Les sérums ont été testés aux dilutions de test recommandées pour chaque fabricant. Les résultats de l'étude sont résumés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

DIAGNOSTIC	Nombre de Patients	Positivité Immuno Concepts 1:40	Positivité Cellules KB 1:20	Positivité Reins de Souris 1:20
LED	23	23	22	21
MCTD/chevauchement	7	7	6	4
Raynaud PSS-CREST	17	17	16	7
Polyarthrite rhumatoïde	2	2	2	0
Arthrite rhumatoïde juvénile	4	4	4	3
Autres collagénoses	9	9	9	6
Sujets hospitalisés	11	7	3	2
Sujets sains	24	1	1	0

Les patients positifs dans les catégories « autres collagénoses » sur le substrat Immuno Concepts souffraient de la maladie de Horton (1), de collagénose indifférenciée (1), de polymyosite (2), de monoarthrite (2), de polyarthrite (3) et d'autres pathologies non classifiables.

Les sujets hospitalisés positifs à l'ANA sur substrat Immuno Concepts présentaient les pathologies suivantes: diabète (2), arthrite (3), hypothyroïdie (1), néphrite auto-immune (1), qui ne permettent pas de poser le diagnostic de LED.

BIBLIOGRAPHIE

- Robbins, W.C., Holman, H.R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96:575-579, 1979.
- Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. *California Medicine* 104:463-469, 1966.
- Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 7:379-390, 1964.
- Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: *The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D.* Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
- Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 41:73-80, 1980.
- Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. *J. Immunol.* 123:2673-2681, 1979.
- Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 38:248-251, 1979.
- Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Hum. Pathol.* 9:85-91, 1978.
- Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. *Semin. Arthritis Rheum.* 6:83-124, 1976.
- Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. *J. Invest. Dermatol.* 62:526-534, 1974.
- Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *Biol. Chem.* 245:10514 - 10522, 1979.
- Moroi, Y., Peebles, C., Fritzier, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:1627-1631, 1980.
- Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
- Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52:148-159, 1972.
- Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, L. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
- Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073, 1975.
- Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
- Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
- Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 19:711-719, 1976.
- Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
- Kozin, F., Fowler, M., Koeth, S.M. A Comparison of the Sensitivities and Specificities of Different Substrates for the Fluorescent Antinuclear Antibody Test. *Am. J. Clin. Pathol.* 74:785-790, 1980.
- McCarty, G.A., Rice, J. R. Characterization and Comparison of Available Antinuclear Antibody Kits Using Single Pattern Index Sera. *J. Rheum.* 7:339-347, 1980.
- Hahon, N., Eckert, H. L., Stewart, J. Evaluation of Cellular Substrates for Antinuclear Antibody Determinations. *J. Clin. Microbiol.* 2:42-45, 1975.
- Cleymaet, J. E., Nakamura, R.M. Indirect Immunofluorescent Antinuclear Antibody Tests: Comparison of Sensitivity and Specificity of Different Substrates. *Am. J. Clin. Pathol.* 58:388-393, 1972.
- Tan, E.M., Rodnan, G. P., Garcia, I., et al. Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 23:617-625, 1980.
- Miyachi, K., Fritzier, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. *J. Immuno.* 121:2228-2234, 1978.

27. McCarty, G. A., Barada, F. A., Snyderman, R., et al. A New Autoantibody Staining Pattern, the Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics, Clinical Occurrence, and Cytoskeletal Studies. *Arthritis Rheum.* 24:S109, 1981.
28. McCarty, G. A., Valencia, D. W., Fritzier, M. J. Antibody to Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics and Cytological Studies. *J. Rheum.* 11:213-218, 1984.
29. Weller, T.H., Coons, A.H. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:789-794, 1954.
30. Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Diseases. *Diagnostic Medicine.* Sept. - Oct. 1979.
31. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Int. Med.* 83:464-469, 1975.
32. McDuffie, F. C., Burch, T.N. Immunologic Tests in the Diagnosis of Rheumatic Diseases. *Bull. Rheum. Dis.* 27:900-911, 1976.
33. von Mühlen, C. A., Tan, E. M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. *Sem. in Arthritis and Rheum.* 24:323-358, 1995.
34. Nakamura, R.M., Peebles, C.L., Penn, G.M. Antibodies to Nuclear Antigens (ANA): Atypical Indirect Immunofluorescent Test for Antibodies to Nuclear Antigens (ANA) in a Case of Idiopathic Thrombocytopenia. *Clinical Immunology Check Sample No. C-1-20.* American Society of Clinical Pathologists, 1980.
35. Fritzier, M. J., Valencia, D.W., McCarty, G.A. Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies. *Arthritis Rheum.* 27:92-96, 1984.
36. Gabbiani, G., Ryan, G.B., Lamelin, J.P., et al. Human Smooth Muscle Antibody. *Am. J. Pathol.* 72:473-488, 1973.
37. Mead, G.M., Cowin, P., Whitehouse, J.M.A. Antitubulin Antibody in Healthy Adults and Patients with Infectious Mononucleosis and its Relationship to Smooth Muscle Antibody (SMA). *Clin. Exp. Immunol.* 39:328-336, 1980.
38. Klatskin, G., Kantor, F.S. Mitochondrial Antibody in Primary Biliary Cirrhosis and Other Diseases. *Ann. Int. Med.* 77:553-541, 1972.
39. McMillan, S.A., Haire, M. Smooth Muscle Antibody in Patients with Warts. *Clin. Exp. Immunol.* 21:339-344, 1975.
40. Anderson, P., Small, J.V., Sobieszek, A. Studies on the Specificity of Smooth Muscle Antibodies. *Clin Exp. Immunol.* 26:57-66, 1976.
41. Lidman, K., Biberfeld, G., Fagraeus, A., et al. Anti-actin Specificity of Human Smooth Muscle Antibodies in Chronic Active Hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 24:266-272, 1976.
42. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. *Arch. Int. Med.* 117:620-626, 1966.
43. Fritzier, M.J., Tan, E.M. Antibodies to Histones in Drug-Induced and Idiopathic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Invest.* 62:560-567, 1978.
44. Gladman, D.D., Chalmers, A., Urowitz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus with Negative LE Cells and Antinuclear Factors. *J. Rheum.* 5:142-147, 1978.
45. Data on file at Immuno Concepts.

Si l'emballage de protection est endommagé, veuillez contacter Immuno Concepts avant toute utilisation.

	Constructeur		Représentant autorisé dans le Communauté européen
	Limitation de la Température		Contient suffisamment pour <n> essais
	Consultez les instructions pour l'usage		Dispositif Médical Diagnostique In vitro
	MDSS GmbH Schiffgraben 41 D-30175 Hannover, Germany		

Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

PROCÉDURE DE TEST ANA FLUORESCENT

REMARQUE: Si le laboratoire utilise un système d'échantillonnage automatisé, il est recommandé de suivre la procédure et les recommandations du fabriquant. Les dilutions, le volume des échantillons déposés sur les lames et les temps d'incubation sont les suivants.

- 1. RECONSTITUTION DU TAMPON (PBS)**
Dissoudre le contenu d'un sachet de tampon dans un litre d'eau désionisée ou distillée. Le tampon peut être couvert et conservé à 2-25°C pendant quatre semaines.
- 2. DILUTION DES ÉCHANTILLONS DES PATIENTS**
Test: Diluer les échantillons à 1:40 en ajoutant 0,05 ml (50 µl) de sérum à 1,95 ml de PBS reconstitué.
Titration semi-quantitative: Procéder à des dilutions successives du ou des échantillons à analyser (ex.: 1:80, 1:160, 1:320...etc.) à l'aide du PBS.
- 3. PRÉPARATION DES LAMES DE SUBSTRAT (20-25 µl/puits)**
Sortir les lames des sachets et placer les sérums de contrôle sur les puits de contrôle comme suit: retourner le flacon compte-gouttes du contrôle et le presser légèrement jusqu'à ce qu'une goutte apparaisse à l'extrémité de l'embout. Mettre soigneusement la goutte en contact avec les puits de contrôle appropriés en évitant tout contact direct de l'embout du compte-gouttes avec la surface de la lame. Ajouter 1 goutte (20-25 µl) d'échantillon du patient dans les puits numérotés.
REMARQUE: Pour le test général, le contrôle positif homogène est recommandé. Pour le titrage semi-quantitatif, sélectionner le contrôle positif illustrant l'image fluorescente la plus proche de l'échantillon à analyser (ex.: pour un échantillon de patient induisant une image mouchetée lors du test, utiliser le contrôle positif moucheté).
ATTENTION: LE CONTACT DIRECT DE L'EMBOU DU COMPTE-GOUTTES AVEC LA SURFACE DE LA LAME PEUT ALTÉRER LE SUBSTRAT ANTIGÉNIQUE.
- 4. INCUBATION DES LAMES (30 minutes ± 5 minutes à température ambiante, soit 18-25°C)**
Placer les lames dans une chambre humide couverte (une boîte de Pétri avec des serviettes en papier humidifiées conviendra). Mettre à incuber, couvercle fermé, pendant 30 minutes (± 5 minutes) à température ambiante (18-25°C).
- 5. RINÇAGE EN TAMPON PBS**
Sortir les lames du plateau de l'incubateur et les rincer rapidement avec le tampon PBS à l'aide d'un flacon gicleur ou d'une pipette Pasteur ou sérologique. Ne pas asperger le tampon directement sur les puits.
REMARQUE: Afin d'éviter toute contamination croisée sur les lames, diriger le jet du tampon PBS le long de la ligne médiane de la lame, en l'inclinant d'abord vers la rangée de puits supérieure puis vers la rangée inférieure.
- 6. LAVAGE EN TAMPON PBS (10 minutes)**
Laver la ou les lames pendant 10 minutes avec du PBS dans une cuve à coloration ou une jarre Coplin. Ce lavage peut être prolongé de 10 à 30 minutes sans que les résultats des tests finaux n'en soient affectés. Jeter la solution de lavage PBS après utilisation.
- 7. RÉACTIF IMMUNOFLUORESCENT (couvrir les puits avec 12 à 14 gouttes)**
Retirer les lames une à une du tampon PBS et les immerger 3 à 5 fois dans de l'eau désionisée ou distillée. Tapoter la tranche de la lame sur du papier absorbant ou des serviettes en papier pour éliminer l'excès d'eau. Remettre immédiatement la lame dans la chambre d'incubation et recouvrir complètement les puits de réactif immunofluorescent. Commencer par placer une goutte sur chaque puits. Recommencer l'opération pour chaque lame. Le réactif immunofluorescent a été titré de façon à compenser l'eau désionisée ou distillée résiduelle restant sur la lame après le rinçage.
REMARQUE: Il est important que les puits de la lame ne se dessèchent pas pendant cette procédure sous peine d'altérer le substrat.
NE PAS SÉCHER LA LAME OU OUBLIER DE LA RECOUVRIRE DE RÉACTIF IMMUNOFLUORESCENT PENDANT PLUS DE 15 SECONDES.
- 8. INCUBATION DES LAMES (30 minutes ± 5 minutes à température ambiante, soit 18-25°C)**
Placer le couvercle sur la chambre d'incubation puis, si la chambre n'est pas opaque, la couvrir d'une serviette en papier pour l'abriter de la lumière. Laisser la ou les lames incuber pendant 30 minutes (± 5 minutes) à température ambiante (18-25°C).
- 9. RINÇAGE EN TAMPON PBS**
Sortir les lames du plateau d'incubation et les rincer rapidement avec du PBS. Ne pas asperger le tampon directement sur les puits.
- 10. LAVAGE EN TAMPON PBS (10 minutes)**
Laver la ou les lames pendant 10 minutes avec du PBS dans une cuve à coloration ou une jarre Coplin. Ce lavage peut être prolongé de 10 à 30 minutes sans que les résultats des tests finaux n'en soient affectés si l'on n'utilise pas de contre-colorant.
Contre-colorant optionnel: Ajouter 5 à 10 gouttes de contre-colorant (bleu d'Evans à 0,5%) pour 100 ml de PBS avant l'immersion de la lame. Étant donné que le degré de contre-coloration souhaité peut varier selon les individus, il suffit, pour en augmenter ou en diminuer l'intensité, d'ajuster le nombre de gouttes ajoutées au PBS au cours de cette étape de lavage.
- 11. MONTAGE DE LA LAMELLE COUVRE-OBJET**
Retirer les lames une à une du tampon PBS et les immerger 3 à 5 fois dans de l'eau désionisée ou distillée (Optionnel). Tapoter la tranche de la lame sur du papier absorbant ou des serviettes en papier pour éliminer l'excès d'eau.
NE PAS SÉCHER LA LAME OU OUBLIER DE LA RECOUVRIRE DE LA LAMELLE COUVRE-OBJET PENDANT PLUS DE 15 SECONDES.
Ajouter 4 à 5 gouttes de milieu de montage semi-permanent sur la ligne médiane de chaque lame. Mettre soigneusement la lamelle couvre-objet en place en évitant la formation de bulles d'air; pour cela, abaisser doucement la lamelle d'un côté de la lame vers l'autre.
REMARQUE: Un excès de milieu de montage sur la lame peut entraîner une forte fluorescence de fond en raison de l'accumulation de lumière ou être à l'origine d'un manque de résolution des cellules (image floue). Afin d'éliminer l'excès de milieu de montage sur la lame, essuyer soigneusement la lamelle couvre-objet avec du papier absorbant ou un nettoyant optique tout en évitant de déplacer la lamelle.

POUR L'ASSISTANCE TECHNIQUE: +1-916-363-2649
ou messagerie électronique: technicalsupport@immunoconcepts.com

