



## **SYSTÈME DE TEST D'ANTICORPS FLUORESCENTS LKS DE RONGEUR HISTOFLUOR<sup>®</sup>**

*Pour utilisation diagnostique in vitro  
Réservé à un usage professionnel.*

*UTILISATION PRÉVUE : Il s'agit d'un test d'immunofluorescence indirecte pour la détection qualitative et semi-quantitative d'auto-anticorps IgG dans le sérum humain par microscopie par fluorescence manuelle ou avec le microscope à fluorescence semi-automatique Image Navigator<sup>®</sup>. Ce système de test doit être utilisé pour faciliter la détection d'auto-anticorps anti-mitochondries (AMA), anti-cellule pariétale (APCA) et anti-muscle lisse (ASMA) associés à l'hépatite auto-immune de type 1, l'angiocholite biliaire primaire et l'anémie pernicieuse/gastrite auto-immune en conjonction avec d'autres observations de laboratoire et cliniques. Un opérateur qualifié doit confirmer les résultats obtenus avec l'appareil semi-automatique Image Navigator<sup>®</sup> et le logiciel.*

### **RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST**

Les auto-anticorps trouvés chez l'homme sont dirigés contre différents antigènes. Plusieurs de ces antigènes sont hautement conservés, si bien que l'on retrouve des épitopes pratiquement identiques dans les tissus des animaux et dans ceux de l'homme. L'utilisation de tissus d'origine animale pour la détection de ces anticorps constitue de ce fait une procédure de laboratoire bien établie. De nombreux auto-anticorps détectés sur des tissus d'origine animale sont étroitement associés à des maladies auto-immunes spécifiques chez l'homme. La détection et la quantification d'auto-anticorps donnés permettent le diagnostic et la surveillance de ces maladies auto-immunes (1,2).

### **PRINCIPE DU TEST**

Le système de test LKS de rongeur Histofluor<sup>®</sup> d'Immuno Concepts utilise la technique d'anticorps à fluorescence indirecte initialement décrite par Weller et Coons (3). Les échantillons du patient sont mis à incuber avec un substrat antigénique (foie, reins, estomac de rongeur) afin de permettre la liaison particulière des auto-anticorps à certains composants cellulaires. En présence d'auto-anticorps, un complexe antigène-anticorps stable se forme. Après le rinçage destiné à éliminer les anticorps non recherchés et non liés, le substrat est mis à incuber avec un anticorps anti-humain conjugué à de la fluorescéine. Lorsque les résultats sont positifs, un complexe tripartite stable se forme. Il est composé d'un anticorps fluorescent lié à l'auto-anticorps humain, lui-même lié à un antigène cellulaire. Ce complexe peut être visualisé à l'aide d'un microscope à fluorescence. Dans les échantillons positifs, les cellules présentent une fluorescence vert pomme et un motif de coloration qui caractérise la distribution particulière des antigènes au sein des cellules. Si l'échantillon est négatif aux auto-anticorps, les cellules ne présentent pas de motif clairement perceptible produit par fluorescence.

## COMPOSANTS DU SYSTEME – MATERIEL FOURNI

**Utilisation** : tous les composants sont prêts à l'emploi et ne requièrent ni aliquotage ni reconstitution (à l'exception du tampon PBS qui doit être dissous dans de l'eau désionisée ou distillée avant utilisation).

**Conservation** : tous les composants peuvent être conservés au réfrigérateur à une température comprise entre 2 et 10 °C. Après reconstitution, le tampon PBS doit être conservé dans des récipients à bouchon à vis, à une température comprise entre 2 et 25 °C. Le milieu de montage peut être stocké de 2 à 25 °C.

**Stabilité** : tous les composants restent stables pendant au moins 12 mois à compter de la date de fabrication. Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.

### RÉACTIFS

**Lames de substrat **SLIDE****: Coupes fines (environ 4 à 5 micromètres) de foie, de rein, d'estomac ou de rein et d'estomac de rongeur. Les tissus ont été fixés dans un mélange propriétaire d'acétone, d'alcools et d'autres solvants organiques pour préserver les protéines de tissu dans leurs configurations natives. Les lames sont disponibles en lames à 4 puits (souris, réf. 12004-02; rat, réf. 12004-03) et lames à 8 puits (souris, réf. 12008-02; rat, réf. 12008-03). Les KS lames sont disponibles en lames à 4 puits (souris, réf. 12004-04; rat, réf. 12004-05) et lames à 8 puits (souris, réf. 12008-04; rat, réf. 12008-05).

**Contrôle positif destiné aux anticorps anti-mitochondries (AMA) **CONTROL|+****: Réf. N° 12021-02. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain positif comportant des IgG anticorps propres aux antigènes mitochondriaux. Ce sérum présente un motif de coloration anti-mitochondries positif sur le substrat de tissu de rongeur.

**Sérum de contrôle négatif **CONTROL|-****: Réf. N° 12031. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1 ml de sérum de contrôle humain négatif. Ce contrôle peut présenter une faible coloration fluorescente, mais n'affiche aucun motif perceptible.

**Réactif immunofluorescent **CONJFITC****: Réf. N° 12009-02 (9,0 ml) et 12075-02 (23,0 ml). Anticorps de chèvre anti-IgG humaine (gamma) conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Les kits de test complets comprennent des flacons compte-gouttes de précision contenant du réactif prêt à l'emploi. Chaque flacon contient 9 ml de réactif pour 10 lames.

**Contrôle positif optionnel **CONTROL|+****:

Réf. N° 12022-02 (0,5 ml) - Anticorps Anti-Cellules Pariétales (APCA). Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 0,5 ml de sérum de contrôle humain positif comportant des IgG anticorps propres aux antigènes de cellules pariétales. Ce sérum présente un motif d'anti-cellule pariétale positive sur le substrat de tissu de rongeur.

Réf. N° 12023-02 (0,5 ml) - Anticorps Anti-Muscle Lisse (ASMA). Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 0,5 ml de sérum de contrôle humain positif comportant des IgG anticorps propres aux antigènes de muscle lisse. Ce sérum présente un motif de coloration d'anti-muscle lisse sur le substrat de tissu de rongeur.

**Sérums de contrôle titrable en option **TC****:

Réf. N° 12261-02 (0,25 ml) - AMA. Flacon prêt à l'emploi contenant 0,25 ml de sérum de contrôle humain positif d'anti-mitochondries devant être traité comme un échantillon de patient non dilué. Voir l'étiquette du flacon pour la valeur de titre.

Réf. N° 12262-02 (0,25 ml) - APCA. Flacon prêt à l'emploi contenant 0,25 ml de sérum de contrôle humain positif d'anti-cellule pariétale devant être traité comme un échantillon de patient non dilué. Voir l'étiquette du flacon pour la valeur de titre.

Réf. N° 12263-02 (0,25 ml) - ASMA. Flacon prêt à l'emploi contenant 0,25 ml de sérum de contrôle humain positif d'anti-muscle lisse devant être traité comme un échantillon de patient non dilué. Voir l'étiquette du flacon pour la valeur de titre.

### COMPOSANTS NON RÉACTIFS

**Poudre tampon PBS **PWDR|PBS****: Réf. N° 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 un litre de solution. (Les kits de test complets contiennent un sachet de poudre tampon pour cinq lames.)

**Préparation** : dissoudre un sachet de poudre tampon dans un litre d'eau désionisée ou distillée, couvrir puis conserver à une température comprise 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. N° 1111. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 5 ml de milieu de montage à base de glycérol.

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

## MATERIEL SUPPLEMENTAIRE REQUIS MAIS NON FOURNI

Pipettes volumétriques permettant de prélever 30 à 40 µl  
Jarres de 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-écran de 515 nm

## PRECAUTIONS

1. Tous les matériaux d'origine humaine utilisés pour 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), du virus de l'hépatite C (VHC) et de l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBS) selon les méthodes approuvées par la FDA. Toutefois, aucune méthode de test ne peut assurer totalement l'absence du VIH 1, du VIH 2, du virus de l'hépatite C, du virus de l'hépatite B ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, tous les matériaux contenus dans le kit doivent être manipulés de la même manière que des matériaux potentiellement infectieux.
2. Tous les échantillons de patient doivent être manipulés selon les recommandations du niveau de biosécurité 2 pour tout échantillon de sérum ou de sang humain potentiellement infectieux, comme indiqué dans le manuel des Centers for Disease Control/National Institutes of Health : *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, édition 1999*.
3. La dilution des composants ou la substitution de composants autres que ceux fournis dans ce système peuvent produire des résultats incohérents.
4. L'azide de sodium (0,09 %) est utilisé comme conservateur dans certains réactifs. 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 courante pour 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, chauffer les sérums inactivés pendant 30 minutes à 56 °C pour des résultats optimaux. Ne pas utiliser les sérums contaminés par des microbes.
7. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs de kits sont manipulés.
8. Éviter toute éclaboussure ou pulvérisation d'aérosols à tout moment.
9. Les durées et les températures d'incubation autres que celles indiquées peuvent produire des résultats inexacts.
10. La contamination croisée des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
11. 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 toute utilisation.
12. Avant utilisation, porter tous les réactifs, lames et échantillons à température ambiante (de 18 à 25 °C).
13. Porter des gants jetables lors de la manipulation d'échantillons et de réactifs, et se laver soigneusement les mains ensuite.
14. La contamination des réactifs ou des échantillons par des microbes peut donner de faux résultats.
15. Ne jamais pipetter 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.

## PRELEVEMENT D'ÉCHANTILLONS

**Prélèvement** : le sérum est l'échantillon privilégié. Prélever de manière aseptique environ 5 ml de sang entier par ponction veineuse à l'aide d'un tube de prélèvement sous vide stérile ou d'un autre système de prélèvement adapté. Laisser le sang coaguler à température ambiante (de 18 à 25 °C). Séparer le sérum du caillot par centrifugation aussi rapidement que possible pour limiter l'hémolyse.

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

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

**ATTENTION** : les congélations et décongélations répétées des échantillons de patient peuvent produire des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

## INTERPRETATION DES RESULTATS

### 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 dans les structures de tissu appropriées avec un motif clairement perceptible, caractéristique du sérum de contrôle utilisé. Le contrôle négatif doit présenter une fluorescence vert terne non précise et de faible intensité dans le cytoplasme et le noyau, mais sans motif de coloration perceptible. Le contrôle PBS est utilisé pour observer une coloration non précise par le réactif anticorps et ne doit présenter aucune fluorescence verte. Si les contrôles n'apparaissent pas tels que décrits, le test n'est pas valable et doit être recommencé.

Il est important de ne pas confondre l'intensité de la fluorescence avec la présence ou l'absence d'anticorps. Pour déterminer si une dilution de sérum donnée est positive, le premier facteur à considérer est l'apparition d'un motif clairement perceptible, quelle que soit l'intensité de la coloration fluorescente.

### CONTRÔLES TITRABLES EN OPTION

Le sérum de contrôle titrable est destiné à être utilisé pour surveiller la reproductibilité inter-lot et inter-analyse. Ils ne sont pas conçus comme une mesure de l'ensemble de la sensibilité ou de la spécificité du test.

À la lecture des titres, de nombreux laboratoires commencent avec la cupule qui contient l'échantillon le plus dilué et font une lecture « inversée » au niveau de dilution 1:20.

Le titrage moyen et la plage de titrage ( $\pm$  une dilution de chaque côté de la moyenne) déterminés pour ce numéro de lot ont été établis dans notre laboratoire et sont présentés à titre de guide. Ce contrôle est fourni pour permettre à chaque laboratoire d'évaluer la reproductibilité (précision) de ses essais. Bien que ce contrôle ne soit pas destiné à être un indicateur de précision du titrage, chaque laboratoire doit établir son point final de titrage pour cet échantillon et doit utiliser cette information pour évaluer la reproductibilité séquentielle (précision).

Grâce à de multiples essais du contrôle titrable, à l'aide du système de test LKS (foie, rein, estomac) de rongeur Histofluor<sup>®</sup> d'Immuno Concepts, une valeur de titrage moyen a été établie pour chaque numéro de lot. Le numéro de lot, le titrage moyen et la plage de titrage ( $\pm$  une double dilution sur l'autre partie si la la moyenne) sont indiqués sur l'étiquette du flacon et doivent être utilisés comme un guide pour l'exécution du test.

Les valeurs obtenues dans notre laboratoire peuvent différer de vos valeurs.

Voici quelques-uns des nombreux facteurs pouvant affecter les résultats :

1. Type de source lumineuse utilisé. Les sources de lumière au mercure génèrent une plus grande énergie d'excitation à 495 nm que le quartz ou 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 ou à l'halogène 100 watts génèrent une plus grande énergie d'excitation à 495 nm que le quartz ou 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 de l'énergie d'excitation peut entraîner une perte de sensibilité importante au fil des semaines. Il est possible d'éviter ce problème 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 ou à l'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 commercial pour plus d'informations.
4. Alignement correct de l'axe optique du microscope. Se reporter au manuel du microscope à fluorescence pour obtenir des instructions.
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 amener 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 des longueurs d'onde d'excitation précises et peuvent être utilisés pour réduire la sensibilité. Se reporter au manuel du microscope à fluorescence ou contacter le représentant commercial 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 100X est recommandé pour les résultats positifs/négatifs du dépistage, tandis qu'un grossissement total de 200X est recommandé pour la reconnaissance du motif.

**Négatif** : un sérum est considéré comme négatif s'il n'existe aucun motif clairement perceptible. Le tissu peut présenter une faible coloration, mais n'affiche aucun motif clairement perceptible.

**Positif** : un sérum est considéré comme positif si le tissu présente un motif de coloration clairement perceptible.

**Titres** : À la lecture des titres, de nombreux laboratoires commencent avec la cupule qui contient l'échantillon le plus dilué et font une lecture « inversée » au niveau de dilution 1:20. La première cupule dans laquelle un motif discernable est visible est le point d'extrémité du titre. Nous recommandons cette technique pour déterminer les points d'extrémité des titres. Il est important que l'intensité de la coloration ne soit pas confondue avec la présence ou l'absence d'anticorps antimitochondriaux ou antipariétaux. Le facteur clé à considérer pour déterminer si une dilution donnée de sérum est positive est l'apparence d'un motif clairement discernable, indépendamment de l'intensité de la coloration.

## COMMUNICATION DES RESULTATS

**Dépistage** : les résultats doivent être notés positifs ou négatifs à la dilution 1:20 et le motif de coloration doit être signalé.

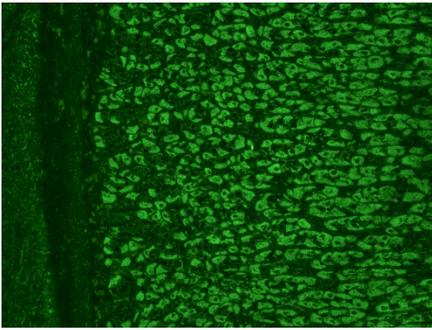
**Titrage** : Les résultats doivent être signalés comme la dernière dilution progressive dans laquelle une coloration clairement discernable est visible. Les résultats ayant une forte réaction au niveau de dilution 1:320 doivent être signalés comme étant supérieurs à 1:320.

### DÉTECTION DU MOTIF

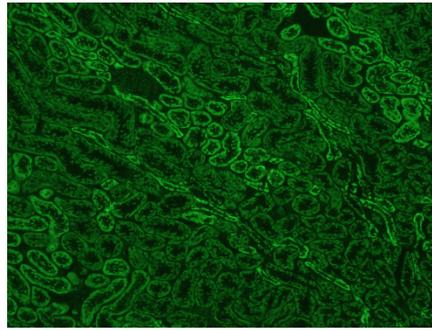
**Anticorps anti-mitochondries (AAM)** : coloration cytoplasmique granulaire des cellules de Kupffer et des cellules hépatiques dans le foie ; une coloration cytoplasmique granulaire est également observée dans les tubules rénaux, la coloration étant la plus intense dans les tubules distaux, plus riches en mitochondries que les tubules proximaux ; le cytoplasme des cellules gastriques présente également une coloration granulaire, celle-ci étant plus intense dans les cellules pariétales que dans les cellules adénomorphes.

**Antigène** : l'antigène le plus couramment détecté dans les mitochondries est le M2, qui correspond à un complexe de plusieurs peptides antigéniques du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH).

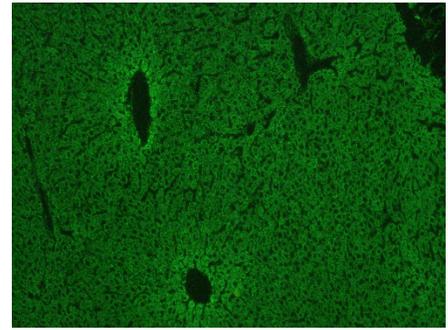
**Association clinique** : les AAM sont observés chez 95 % des patients atteints de cirrhose biliaire primitive (CBP) (4,5).



**AAM dans l'estomac du rongeur**



**AAM dans le rein du rongeur**

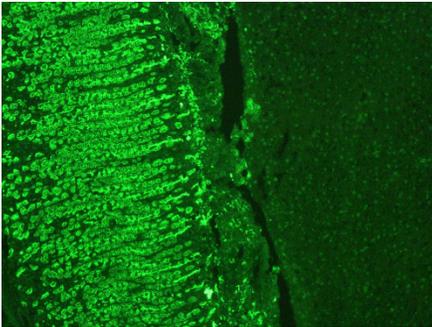


**AAM dans le foie du rongeur**

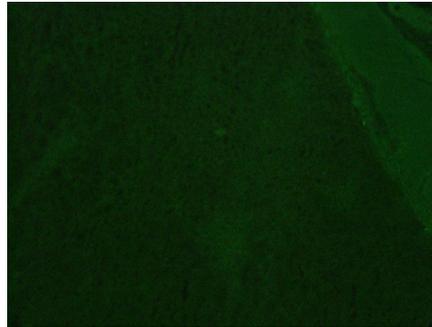
**Anticorps anti-cellules pariétales (ACCP) :** dans l'estomac, le tissu présente une coloration cytoplasmique granulaire intense des cellules pariétales, disposée de manière linéaire et parallèle, sans coloration des cellules adénomorphes. L'antigène n'est pas exprimé dans le rein ni dans le foie du rongeur. Ces tissus sont donc négatifs, avec seulement une fluorescence de fond.

**Antigène :** l'antigène correspond à la pompe à protons H+K+ATPase.

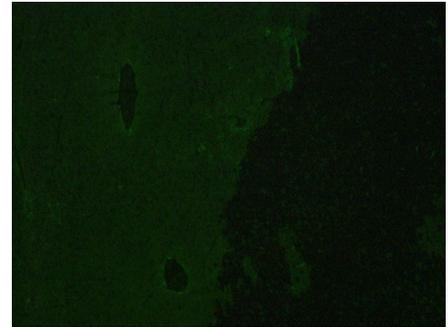
**Association clinique :** les ACCP sont présents chez plus de 90 % des patients atteints d'anémie pernicieuse. La gastrite atrophique est souvent un précurseur de l'anémie pernicieuse. Par conséquent, les anticorps peuvent également être présents chez les patients souffrant de gastrite atrophique auto-immune (6,7).



**ACCP dans l'estomac du rongeur (négatif)**



**ACCP dans le rein du rongeur (négatif)**

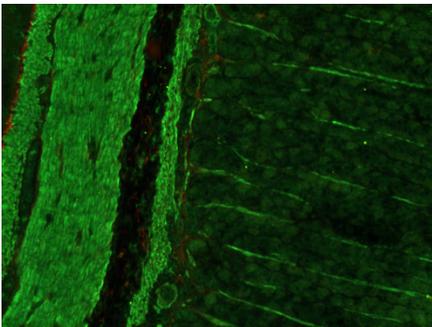


**ACCP dans le foie du**

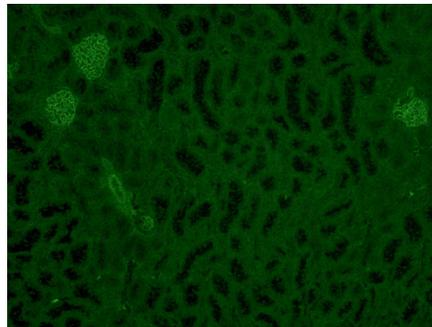
**Anticorps anti-muscle lisse (AAML) :** Dans l'estomac, le tissu présente une coloration intense des fibres musculaires lisses au niveau de la couche musculaire, de la muqueuse musculaire, de la région de la glande intergastrique et des couches de muscles lisses des artères. Dans le foie, le tissu présente une coloration intense des fibres musculaires lisses sur les parois des artères. Dans le rein, des titres élevés d'anticorps anti-actine peuvent provoquer une réaction croisée avec des fibres de tubuline dans le glomérule.

**Antigène :** l'actine est le principal antigène cliniquement important. Toutefois, des anticorps dirigés contre la vimentine, la tubuline, la desmine et d'autres protéines des fibres musculaires lisses ont également été décrits.

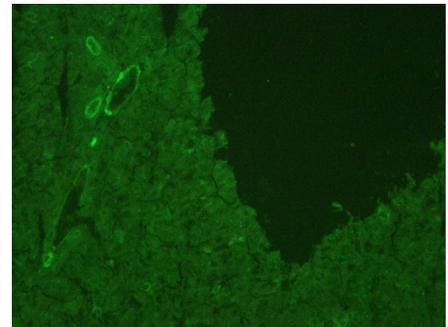
**Association clinique :** hépatite chronique auto-immune (type 1) (8-10).



**AAML dans l'estomac du rongeur**



**AAML dans le rein du rongeur**



**AAML dans le foie du rongeur**

## LIMITES DU TEST

1. Le diagnostic ne peut pas être établi sur la base unique d'une détection d'anticorps dans les tissus de rongeur. Le médecin doit interpréter ces résultats en fonction 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. Les indications cliniques, les autres analyses de laboratoire et le diagnostic clinique du médecin doivent être pris en considération avant le début d'un traitement.
3. Bien qu'une réaction positive soit très évocatrice d'une maladie du tissu conjonctif, elle ne doit pas être considérée comme un élément diagnostic, mais plutôt comme faisant partie des antécédents cliniques d'un patient.
4. Les motifs de coloration peuvent changer souvent avec le titrage progressif des sérums. Ce phénomène est généralement dû à la présence de plusieurs états pathologiques.
5. En raison des nombreuses options disponibles sur les microscopes à fluorescence, il est recommandé de normaliser les sources de lumière, les filtres et les dispositifs optiques lors de la comparaison de titres de patients entre différents laboratoires.
6. Immuno Concepts recommande l'utilisation de cellules transfectées cultivées (HEp-2000®) pour la détermination d'anticorps antinucléaires (AAN) et ne recommande pas l'utilisation de tissu de rongeur pour la détection ou l'identification d'AAN.

## CARACTÉRISTIQUES DE RENDEMENT

Le système de test LKS de rongeur Histofluor® a été comparé à un autre kit de test d'anticorps par immunofluorescence de tissu de rongeur qui est en distribution dans le commerce à l'aide de 170 échantillons caractérisés sur le plan clinique. Les échantillons ont été testés sur trois sites et lus par trois opérateurs sur chaque site. En utilisant la microscopie par fluorescence classique, les données ci-dessous ont été obtenues. Les valeurs en accord représentent le consensus de l'arbitrage des meilleurs de deux sur trois déterminations provenant des trois sites.

### Tissu de Rat

Accord positif: 92,3 % (79,0 à 98,1)  
Accord de motif: 92,3 % (79,0 à 98,1)  
Accord négatif: 97,8 % (93,4 à 99,5)  
Accord dans l'ensemble: 98,2 % (94,7 à 99,6)

### Tissu de Souris

Accord positif: 94,4 % (80,9 à 99,4)  
Accord de motif: 94,4 % (80,9 à 99,4)  
Accord négatif: 98,5 % (94,5 à 99,9)  
Accord dans l'ensemble: 98,8 % (95,5 à 99,9)

### UTILISATION AVEC IMAGE NAVIGATOR®

Image Navigator® est le système de microscope semi-automatique d'Immuno Concepts destiné à la lecture des lames fluorescentes d'Histofluor®. Une comparaison de la lecture de surveillance d'Image Navigator® à la lecture classique des lames de tissu fluorescentes de rongeur du système Histofluor® du système de test LKS de rongeur Histofluor® a été réalisée à l'aide de 170 échantillons testés caractérisés cliniquement sur trois sites et lus par trois opérateurs sur chaque site. Les valeurs en accord représentent le cosensus de l'arbitrage des meilleurs de deux sur trois déterminations provenant des trois sites.

### Tissu de Rat

Accord positif: 100 % (87,9 à 100)  
Accord de motif: 100 % (87,9 à 100)  
Accord négatif: 100 % (96,6 à 100)  
Accord dans l'ensemble: 100 % (97,3 à 100)

### Tissu de Souris

Accord positif: 100 % (88,5 à 100)  
Accord de motif: 100 % (88,5 à 100)  
Accord négatif: 100 % (96,7 à 100)  
Accord dans l'ensemble: 100 % (97,3 à 100)

La sensibilité clinique pour la détection d'auto-anticorps chez les patients connus pour avoir une anémie pernicieuse, une hépatite auto-immune de type 1, ou une cholangite biliaire primaire est indiquée dans les tableaux ci-dessous. Dans ces études, une valeur seuil de dilution de 1:20 a été utilisée pour déterminer les échantillons positifs.

<b>Sensibilité Clinique (95% CI)</b>		Foie/Rein/Estomac de Souris Histofluor®			
Diagnostic	N	Classique	% Positif	Image Navigator®	% Positif
L'anémie Pernicieuse	12	5	41.7% (19.3-68.1)	5	41.7% (19.3-68.1)
L'hépatite Auto-Immune de Type 1	19	9	47.4% (27.3-68.3)	9	47.4% (27.3-68.3)
Cholangite Biliaire Primaire	18	15	83.3% (60.0-95.0)	15	83.3% (60.0-95.0)

<b>Sensibilité Clinique (95% CI)</b>		Foie/Rein/Estomac de Rat Histofluor®			
Diagnostic	N	Classique	% Positif	Image Navigator®	% Positif
L'anémie Pernicieuse	12	6	50.0% (25.4-74.6)	6	50.0% (25.4-74.6)
L'hépatite Auto-Immune de Type 1	19	9	47.4% (27.3-68.3)	9	47.4% (27.3-68.3)
Cholangite Biliaire Primaire	18	15	83.3% (60.0-95.0)	15	83.3% (60.0-95.0)

La spécificité clinique a été déterminée dans un groupe de 121 patients atteints de maladies auto-immunes autres que l'anémie pernicieuse, l'hépatite auto-immune de type 1, ou la cholangite biliaire primaire. Les données de ces comparaisons sont indiquées dans le tableau ci-dessous. Dans ces études, une valeur seuil de dilution de 1:20 a été utilisée pour déterminer les échantillons positifs.

<b>Spécificité Clinique (95% CI)</b>		Foie/Rein/Estomac de Souris Histofluor®			
Groupe	N	Classique	% Négatif	Image Navigator®	% Négatif
Patients Auto-Immuns	121	114	94.2% (88.3-97.4)	114	94.2% (88.3-97.4)

<b>Spécificité Clinique (95% CI)</b>		Foie/Rein/Estomac de Rat Histofluor®			
Groupe	N	Classique	% Négatif	Image Navigator®	% Négatif
Patients Auto-Immuns	121	113	93.4% (87.3-96.8)	113	93.4% (87.3-96.8)

**Précision:** Selon les exigences de CLSI EP05-A3, treize échantillons ont été testés en triple exemplaire dans dix événements sur trois sites indépendants. L'ensemble échantillon comprenait quatre échantillons positifs d'AMA, quatre échantillons positifs d'APCA, quatre échantillons positifs d'ASMA et un échantillon négatif. Chaque résultat a été lu et de façon classique et par Image Navigator® par deux lecteurs. Pour démontrer les données dans un format semi-quantitatif, l'accord de point final du titre est indiqué ci-dessous pour l'intérieur des sites et entre les sites. Tous les accords ont été > 90,0 %.

Reproductibilité Multisite Multilecteur (% d'accords avec 95 % d'intervalle de confiance)								
Substrat	Mesure	n	Classique			Surveillance (Semi-automatique)		
			Site 1 v 2	Site 1 v 3	Site 2 v 3	Site 1 v 2	Site 1 v 3	Site 2 v 3
RAT	Positif	720	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)
	Négatif	60	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)
	Motif	720	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)
	± 1 Titer	720	95.4% (93.6-96.7)	95.8% (94.1-97.1)	96.5% (94.9-97.7)	95.3% (93.5-96.6)	95.3% (93.5-96.6)	96.7% (95.1-97.8)
SOURIS	Positif	720	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)
	Négatif	60	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)
	Motif	720	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)
	± 1 Titer	720	94.9% (93.0-96.3)	97.8% (96.4-98.7)	94.4% (92.5-95.9)	96.8% (95.2-97.9)	98.9% (97.8-99.5)	96.5% (94.9-97.7)

## BIBLIOGRAPHIE

1. Nakamura RM, Chisari FV, Edington TS. Laboratory tests for diagnosis of autoimmune diseases. *Prog Clin Pathol.* 1975;6:177-203.
2. Craig WY, Ledue TB, Collins MF, et al. Serologic associations of anti-cytoplasmic antibodies identified during anti-nuclear antibody testing. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44:1283-1286.
3. Weller TH, Coons AH. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1954;86:789-794.
4. Jones DEJ. Autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol.* 2000;53:813-821.
5. Purohit T, Cappell MS. Primary biliary cirrhosis: Pathophysiology, clinical presentation and therapy. *World J Hepatol.* 2015;7:926-941.
6. Toh B-H. Pathophysiology and laboratory diagnosis of pernicious anemia. *Immunol Res.* 2017;65:326-330.
7. De Aizpurua HJ, Cosgrove LJ, Ungar B, Toh B-H. Autoantibodies cytotoxic to gastric parietal cells in serum of patients with pernicious anemia. *NEJM.* 1983;309:625-629.
8. Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Clinical significance of autoantibodies and autoimmune hepatitis. *J Autoimm.* 2013;46:17-24.
9. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, et al. Autoantibodies and defined target the auto antigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med.* 2002;13:293-303.
10. Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 1999;30:394-401.

Si l'emballage protecteur est endommagé, contacter Immuno Concepts avant toute utilisation.



Fabricant



Représentant agréé dans la Communauté européenne



Limitation de la température



Contenu suffisant pour <n> tests



Consulter le mode d'emploi



Dipositif médical de diagnostic in vitro



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover, Allemagne



Ordonnance (Rx) seulement - pour utilisation sur ordonnance seulement

Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA, États-Unis. 95827  
Assistance technique États-Unis : 1 800 251 5115 En dehors des États-Unis : 1 916 363 2649  
Adresse électronique : [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

# PROCOLE OPÉRATOIRE FLUORESCENT HISTOFLUOR® SUR TISSU DE RONGEUR

**REMARQUE** : si le laboratoire utilise un système de traitement d'échantillons automatisé, il est nécessaire de suivre la procédure et les recommandations du fabricant. Le système de traitement des lames doit être programmé pour les dilutions d'échantillons, le volume des échantillons déposés et les temps d'incubation appropriés, comme indiqué ci-dessous.

## 1. RECONSTITUTION DU TAMPON (PBS)

Dissoudre le contenu d'un sachet de tampon dans un litre d'eau désionisée ou distillée. Le tampon PBS peut être couvert et conservé à une température comprise entre 2 et 25 °C pendant quatre semaines.

## 2. DILUTION DES ÉCHANTILLONS DES PATIENTS

Dépistage : diluer les échantillons à 1:20 en ajoutant 0,05 ml (50 µl) de sérum à 0,95 ml (950 µl) de PBS reconstitué.  
Titration semi-quantitative : effectuer des dilutions progressives de l'échantillon/des échantillons et le contrôle titrable (par ex., 1:40, 1:80, 1:160, 1:320) en utilisant le PBS.

## 3. PRÉPARATION DES LAMES DE SUBSTRAT (30 à 40 µl/puits)

Sortir la ou les lames du ou 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 sur l'embout. Mettre soigneusement la goutte en contact avec le puits de contrôle approprié en évitant tout contact direct de l'embout du compte-gouttes avec la surface de la lame. Ajouter 1 goutte (30-40 µl) d'échantillon du patient dans les puits numérotés.

**REMARQUE** : pour le dépistage général, le contrôle positif anti-mitochondries est recommandé. Pour le titrage semi-quantitatif, un contrôle titrable, soit la réf 12261-02, 12262-02 ou 12263-02 doit être utilisée avec chaque lot d'échantillons de patients. Tous les contrôles de motif doivent être exécutés avec chaque numéro de lot de kits pour démontrer l'aspect attendu du motif AAN.

**ATTENTION** : LE CONTACT DIRECT DE L'EMBOU DU COMPTE-GOUTTES AVEC LA SURFACE DE LA LAME PEUT ENDOMMAGER LE SUBSTRAT ANTIGÉNIQUE.

## 4. INCUBATION DES LAMES (30 ± 5 minutes à température ambiante, c'est-à-dire de 18 à 24 °C)

Placer la ou les lames dans une chambre humide couverte (une boîte de Pétri avec des serviettes en papier humidifiées convient). Incuber, couvercle fermé, pendant 30 minutes (± 5 minutes) à température ambiante (de 18 à 24 °C).

## 5. RINÇAGE PBS

Enlever la ou les lames du plateau de l'incubateur et rincer rapidement avec un tampon PBS à l'aide d'un flacon pulvérisateur ou d'une pipette sérologique ou Pasteur. Ne pas asperger le tampon directement sur les puits.

**REMARQUE** : afin d'éviter toute contamination croisée sur les lames, diriger le jet de tampon PBS le long de la ligne médiane de la lame, en l'inclinant d'abord vers la rangée supérieure de puits, puis vers la rangée inférieure.

## 6. LAVAGE PBS (10 minutes)

Laver la ou les lames pendant 10 minutes avec du PBS dans une cuve à coloration ou une jarre de Coplin. Ce lavage peut être prolongé de 10 à 30 minutes sans affecter les résultats des tests finaux. Jeter la solution de lavage PBS après utilisation.

## 7. RÉACTIF IMMUNOFLUORESCENT (couvrir les puits avec 12 à 14 gouttes)

Enlever les lames une par une du tampon PBS. Tapoter la tranche de la lame sur du papier absorbant ou une serviette en papier pour éliminer l'excès de tampon. 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 afin de compenser le tampon résiduel restant sur la lame après le rinçage.

**REMARQUE** : il est important que les puits de la lame ne se dessèchent pas pendant cette procédure pour éviter d'endommager le substrat.

**NE PAS SÉCHER LA LAME OU ABSORBER SON CONTENU ET NE PAS LA LAISSER SANS RÉACTIF IMMUNOFLUORESCENT PENDANT PLUS DE 15 SECONDES.**

## 8. INCUBATION DES LAMES (30 ± 5 minutes à température ambiante, c'est-à-dire de 18 à 24 °C)

Placer le couvercle sur la chambre d'incubation et la couvrir d'une serviette en papier pour éviter de l'exposer à la lumière si elle n'est pas opaque. Laisser la ou les lames incuber pendant 30 minutes (± 5 minutes) à température ambiante (de 18 à 24 °C).

## 9. RINÇAGE PBS

Enlever la ou les lames du plateau de l'incubateur et rincer rapidement à l'aide d'un tampon PBS. Ne pas asperger le tampon directement sur les puits.

## 10. LAVAGE PBS (10 minutes)

Laver la ou les lames pendant 10 minutes avec du PBS dans une cuve à coloration ou une jarre de Coplin. Ce lavage peut être prolongé de 10 à 30 minutes sans affecter les résultats des tests finaux lorsqu'aucune contre-coloration n'est utilisée.

## 11. MONTAGE DE LA LAMELLE COUVRE-OBJET

Enlever les lames une par une du tampon PBS. Tapoter la tranche de la lame sur du papier absorbant ou une serviette en papier pour éliminer l'excès de tampon.  
**NE PAS SÉCHER LA LAME OU ABSORBER SON CONTENU ET NE PAS LA LAISSER SANS 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 la diffusion 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 optique tout en évitant de déplacer la lamelle.

## 12. LECTURE DE LA LAME

Si la lame doit être lue par microscopie fluorescente conventionnelle, elle peut être lue immédiatement en utilisant la procédure standard du laboratoire. Les lames doivent toujours être lues par un utilisateur formé qui est familier avec l'interprétation et les motifs des coupes de tissus fluorescents. Consulter le fournisseur du microscope fluorescent pour obtenir les instructions d'utilisation du microscope.

Si la lame doit être lue en utilisant Image Navigator®, le système automatisé de microscopie et de capture d'images d'Immuno Concepts, consultez le manuel d'utilisation du système Image Navigator®. Image Navigator® capture des images numériques de chaque cupule et présente une vue panoramique de la coupe tissulaire aux fins d'examen par un utilisateur formé. Image Navigator® ne doit être utilisé que par un utilisateur formé.

## POUR OBTENIR UNE ASSISTANCE TECHNIQUE :

États-Unis : 1 800 251 5115 En dehors des États-Unis : 1 916 363 2649

Adresse électronique : technicalsupport@immunoconcepts.com

