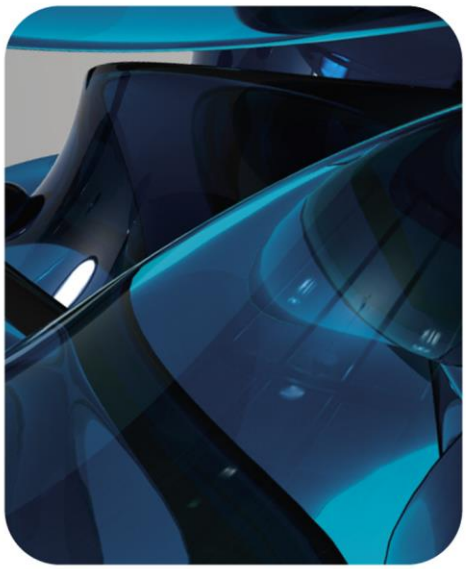
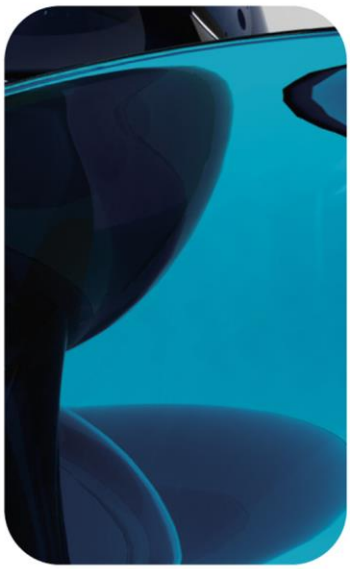
AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS


AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

FRENCH

DIN EN ISO 13485

AESKU.DIAGNOSTICS GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim, Germany
Tel: +49-6734-9622-0
Fax: +49-6734-9622-2222
Info@aesku.com
www.aesku.com

AESKUSLIDES®
THE IFA PRODUCT LINE



Manuel d'instructions

ANA-HEp-2

Réf.	Description	Tests
51.100.Bulk5	ANA-HEp-2 (12 puits) Bulk-Kit	600
51.101.Bulk5	ANA-HEp-2 (12 puits) Bulk-Kit	600

1. USAGE PRÉVU

AESKUSLIDES ANA-HEp-2 est un test d'immunofluorescence indirecte qui permet de détecter des autoanticorps nucléaires et/ou cytoplasmiques dans le sérum humain.

Le test sert au diagnostic différentiel de maladies rhumatiques systémiques comme le lupus érythémateux systémique (LES), les collagénoses mixtes (maladies mixtes du tissu conjonctif ou en anglais mixed connective tissue diseases, d'où l'abréviation MCTD), la sclérodermie, le syndrome de Sjögren, la polymyosite et la dermatomyosite.

2. APPLICATIONS CLINIQUES

Les anticorps anti-nucléaires (ANA) sont dirigés contre de multiples antigènes nucléaires et cytoplasmiques, et ils s'observent très fréquemment dans les maladies rhumatiques systémiques. C'est pourquoi leur dépistage représente un outil important pour le diagnostic différentiel. Ainsi, par exemple, les anticorps anti-SS-A (ou anti-Ro) et anti-SS-B (ou anti-La) sont associés au lupus érythémateux systémique (LES) et au syndrome de Sjögren (SS). Les anticorps contre l'ADN à deux brins (dsDNA en anglais), les anticorps anti-Sm, les anticorps anti-histones et les anticorps anti-nucléosome sont associés au lupus érythémateux systémique (LES). Les anticorps anti-RNP sont associés aux collagénoses mixtes et au LES, les anticorps anti-Scl-70 sont associés à la sclérodermie (sclérose systémique progressive, SSP), les anticorps anti-Jo-1 sont associés à la polymyosite et à la dermatomyosite, et les anticorps dirigés contre la protéine du centromère sont associés au syndrome de CREST. Pour obtenir des détails, voir la Section 4 ci-dessous.

Jusqu'à présent, le test d'immunofluorescence indirecte (IFI) sur des cellules eucaryotiques, comme les cellules HeLa et HEp2, représente la méthode de choix pour le dépistage des ANA. Le test IFI est certes une méthode sensible mais laborieuse quand il s'agit de tester un grand nombre de sérums. Par ailleurs, ce système de test peut être sujet à certaines erreurs ou à certains écarts au niveau de l'interprétation des résultats suivant le personnel des différents laboratoires et les microscopes à fluorescence utilisés. La spécificité des ANA peut être déterminée avec des tests spécifiques ELISA, qui emploient les antigènes spécifiques correspondants. Les tests ELISA permettent une différenciation simple et plus fiable des ANA selon leur spécificité.

Antigène: cellules HEp-2

Réactions croisées: pas de réactions croisées connues

Le test repose sur le principe de l'immunofluorescence indirecte (IFI):

Les lames sont recouvertes de coupes de tissus ou de cellules (HEp2 pour la détection des

ANA (anticorps antinucléaires), granulocytes pour la détection des ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) ou Crithidia luciliae pour la détection d'anticorps anti-ADN natif). Si le sérum du patient contient des anticorps contre des éléments des tissus ou cellules, ceux-ci se fixent au substrat correspondant sur la lame lors de la première étape d'incubation. Les éléments du sérum non fixés sont éliminés par lavage. Les anticorps du patient fixés sont révélés lors d'une deuxième étape d'incubation par des anticorps anti-immunoglobulines humaines marqués à la fluorescéine, qui se fixent aux anticorps du patient fixés et les rendent visibles grâce à leur colorant fluorescent. Il en résulte une fluorescence spécifique verte des complexes antigène-anticorps, qui deviennent visibles au microscope à immunofluorescence.

3. PRINCIPE DU TEST

Consulter la Procédure de test du Instructions commun, section 12, pour des instructions détaillées. Les précisions suivantes se rapportent aux kits ANA HEp-2 :

- Temps de contre-coloration : 30 à 90 secondes
- Dilution de dépistage recommandée :
  - 1:80 pour les échantillons d'adultes
  - 1:40 pour les échantillons pédiatriques

4. INTERPRÉTATION

d'un patient souffrant d'un carcinome du larynx. Le substrat offre une croissance cellulaire homogène sans liens cellulaires. Pour l'évaluation des échantillons, les cellules au stade de mitose sont très importantes, car elles permettent une détermination plus exacte des images nucléaires. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

L'évaluation devrait toujours se faire avec un contrôle positif et un contrôle négatif. Les faibles fluorescences du noyau cellulaire avec des titres de 1:40 (enfants) et 1:80 (adultes) ou un manque de netteté en ce qui concerne les résultats cliniques doivent être vérifiés à l'aide des contrôles.

Dans ce cas, il faut collecter des échantillons de patients environ toutes les 6 semaines et les tester suivant la même procédure. [1]

4.1 Images nucléaires membranaires (membranous nuclear patterns)

4.1.1 Légère fluorescence de la membrane nucléaire (smooth membranous nuclear pattern)

Légère fluorescence homogène de la membrane nucléaire en forme d'anneau dans les cellules en interphase. Certains échantillons avec de forts anticorps peuvent donner l'impression d'une coloration de la totalité du noyau. On peut observer un motif similaire dans les cellules en télophase. En ce qui concerne les cellules en métaphase, cette fluorescence est cependant diffuse dans le cytoplasme et le matériel chromosomique ne se colore pas.

4.1.2 Image ponctuée de la membrane nucléaire (punctate membranous nuclear pattern)

Fluorescence ponctuée discontinue située le long de la membrane nucléaire. En zoomant à travers le noyau, la coloration ponctuée peut être observée sur toute la surface du noyau.

Un motif similaire apparaît dans la télophase. Dans les cellules en métaphase, la fluorescence est diffuse et éparpillée sur le cytoplasme. Certains échantillons avec de forts anticorps peuvent donner l'impression d'une coloration de la totalité du noyau.

---

[1] Wiik A. Scand J Rheumatol 2005; 34:260-8.

4.2 Images du nucléoplasme (nucleoplasmic patterns)

4.2.1 Motifs nucléaires homogènes (homogeneous nuclear patterns)

Fluorescence diffuse uniforme couvrant la totalité du nucléoplasme, parfois accentuée dans la périphérie du noyau et pouvant être associée à différents anticorps qui sont dirigés la plupart du temps contre des composants des chromosomes (ADN, histones, etc.). Dans certains cas, on peut observer une coloration plus intense vers le centre du noyau (nuclear rim).
Certains échantillons peuvent montrer en plus une coloration périphérique des nucléoles. La coloration des nucléoles est variable. Dans la métaphase, on peut observer une coloration homogène ou une coloration de la chromatine.
On peut distinguer deux motifs légèrement différents:

- *Motif nucléaire homogène avec une coloration homogène des nucléoles*
- *Motif nucléaire homogène sans coloration des nucléoles*

4.2.2 Images nucléaires mouchetées (speckled nuclear patterns)

On peut observer plusieurs images nucléaires mouchetées, qui sont difficiles à distinguer les unes des autres. Une observation minutieuse permet de distinguer sept motifs différents. Lors de la métaphase, les chromosomes restent négatifs dans six motifs et présentent une coloration positive dans le motif centromérique.

4.2.3 Mouchetures larges (large speckled nuclear patterns) (matrice nucléaire) (SC35)

Différents gros grains fluorescents répartis sur le nucléoplasme. Par le passé, ce motif fluorescent était appelé « matrice nucléaire ». Ce motif est vraisemblablement causé par la coloration des granules d'interchromatine. Les nucléoles restent négatifs. Au stade de la métaphase et de la télophase, le cytoplasme montre des mouchetures diffuses avec une chromatine négative.

4.2.4 Mouchetures grossières (coarse speckled nuclear pattern)

Mouchetures denses et de différentes tailles, généralement associées à des mouchetures larges, réparties sur le nucléoplasme des cellules en interphase. Les nucléoles restent négatifs. Le cytoplasme des cellules en métaphase et en télophase montre des mouchetures condensées autour de la chromatine. La chromatine reste négative.

Ce motif est associé la plupart du temps à une coloration des splicéosomes.

4.2.5 Fines mouchetures (fine speckled nuclear pattern)

Coloration mouchetée fine répartie régulièrement, parfois très dense, ce qui fait que ce motif ressemble à une image homogène. Les nucléoles peuvent être positifs (surtout avec des anticorps anti-SS-B/La), mais ils peuvent aussi rester négatifs. Le cytoplasme des cellules en métaphase montre de fines mouchetures condensées autour de la chromatine. La chromatine reste négative. Les nucléoles des cellules en télophase peuvent être positifs. Ici, ils sont parfois plus intensément colorés que pour les cellules en interphase.

4.2.6 Image granulaire, comme Scl 70 (grainy Scl-70-like pattern)

Fines mouchetures granuleuses régulières du nucléoplasme et de la région chromosomique des cellules en métaphase et en télophase, souvent avec une accentuation des nucléoles positifs. Avec un faible grossissement, la coloration peut sembler homogène. Ce motif ne s'observe pas seulement sur des sérums positifs en anti-Scl 70.

4.2.7 Image mouchetée pléomorphique (pleomorphic speckled nuclear pattern)

Les noyaux des cellules en phase de prolifération (phase S) montrent une multitude de mouchetures différentes du nucléoplasme, allant de fines à très grossières et irrégulières (selon la préparation des cellules, cela peut concerner 10-50% des cellules). Dans certaines cellules, les nucléoles sont également colorés. Les cellules en phase de repos (phase G) et en métaphase restent négatives. Ce motif est également appelé image anti-PCNA (anti-proliferating cell nuclear antigen) et on l'observe généralement en association avec d'autres motifs.

4.2.8 Motif centromérique (centromere pattern)

Mouchetures isolées, assez uniformes et réparties sur la totalité du noyau (40 à 60 mouchetures par noyau). Les cellules en télophase et en métaphase montrent toujours ces mouchetures dans le matériel chromosomique condensé. Ce motif apparaît en présence d'anticorps dirigés contre les kinétochores des chromosomes. En fait ces anticorps peuvent reconnaître plusieurs protéines distinctes du centromère (CENP-A, B, C, D, E).

4.2.9 Points nucléaires multiples (multiple nuclear dots) (NSp-1 pour nuclear speckled type 1)

5 à 10 grains ou points (dots) par noyau. Ici, il y a une coloration des sous-structures nucléaires, qui sont souvent appelées corps PML (en raison de leur apparition prononcée dans la leucémie aiguë promyélocytaire, en anglais ProMyelocytic Leukemia). Les chromosomes de la métaphase et de la télophase restent négatifs.

4.2.10 Points nucléaires (coiled body pattern) (quelques points nucléaires)

2 à 6 grains ou points (dots) par noyau, localisés dans le nucléoplasme. Ils sont souvent directement voisins avec les nucléoles. Au stade de la métaphase ou de la télophase, il n'y a pas de coloration de la chromatine.

4.3 Images nucléolaires (nucleolar patterns)

4.3.1 Image nucléolaire homogène (homogeneous nucleolar pattern)

Fluorescence du nucléole entier, sans coloration des chromosomes ou des NOR (nucleolar organizer region) dans les cellules en division.

4.3.2 Image nucléolaire granulaire (clumpy nucleolar pattern)

Grosses grappes serrées de granules clairs, qui font partie des composants des centres fibrillaires des nucléoles. Dans les cellules mitotiques, les plaques métaphasique et télophasique semblent avoir une fluorescence irrégulière ressemblant à un éventail (fan-like).

4.3.3 Image nucléolaire ponctuée (punctate nucleolar pattern)

Petits grains séparés, que l'on trouve principalement dans le centre des nucléoles. Dans les cellules en métaphase, on peut trouver 2 à 5 mouchetures discrètes dans le corps de la chromatine qui fait partie des NOR (nucleolar organizer region).

4.4 Images du fuseau (spindle apparatus patterns)

4.4.1 Image des centrioles (centrosome) (centriole (centrosome) spindle pattern)

Le fuseau métaphasique montre des points fluorescents discrets disposés perpendiculairement les uns par rapport aux autres sur chacun des deux pôles du fuseau.

Dans les cellules en interphase, on observe un ou deux points clairs dans le cytoplasme, situés près du noyau.

4.4.2 Image des pôles du fuseau (spindle pole pattern) (NuMA, pour nuclear mitotic apparatus)

Fluorescence au niveau des pôles du fuseau dans les cellules en métaphase (fluorescence triangulaire ou en forme de banane). Les fibres du fuseau sont négatives, avec un motif plutôt linéaire dans les cellules en télophase. La plupart du temps, on observe de fines mouchetures avec des nucléoles négatifs dans les cellules en phase de repos ou en télophase, mais celles-ci peuvent aussi être négatives.

4.4.3 Image des fibres du fuseau (spindle fibre pattern)

Coloration de tout le spindle fibre apparatus du pôle jusqu'aux plaques de chromatine dans les cellules en métaphase. Pas de coloration des chromosomes dans les cellules en phase de repos ou de division

4.4.4 Image MSA-2 (mitotic spindle apparatus type 2) (midbody pattern)

Dans les cellules en prophase et en métaphase, la fluorescence apparaît sous forme de fines bandes dans la région chromosomique, disposées perpendiculairement au côté de la plaque métaphasique. En télophase, la fluorescence est limitée à la zone de séparation des cellules et

à un mince corps intermédiaire (midbody) entre les cellules terminant la phase de division (cytokinèse). Les cellules en phase S et G2 présentent des mouchetures discrètes ou pas uniformes. Le motif est dû à des anticorps dirigés contre l'antigène MSA-2 (mitotic spindle antigen 2).

4.4.5 Image C-F

On trouve le trait le plus caractéristique dans les cellules en métaphase, où le motif est constitué de deux groupes de gros granules denses disposés comme une anse de part et d'autre de la plaque – cela ressemble souvent à une fermeture éclair. Ces granules font partie du centromère. On observe une coloration diffuse du cytoplasme. Dans les cellules en prophase, on observe un amassement dense de petits grains fluorescents. De très fines mouchetures nucléaires denses peuvent être observées dans certaines cellules en interphase. Ce motif est dû à des anticorps dirigés contre l'antigène MSA-3 (mitotic spindle antigen 3), qui peut être identique à la protéine centromérique F (CENP-F).

4.5 Images cytoplasmiques (cytoplasmic fluorescence patterns)

4.5.1 Fines mouchetures du cytoplasme (fine speckled cytoplasmic pattern)

Fines granulations réparties sur tout le cytoplasme. Ces granules apparaissent souvent plus clairement sur la périphérie des cellules et produisent parfois une image ressemblant à un nuage d'étoiles. Pas de coloration des noyaux ou des nucléoles. Ce motif est caractéristique pour les anticorps dirigés contre l'ARNt-synthétase. Le matériel chromosomique est négatif dans les cellules en métaphase.

4.5.2 Image cytoplasmique diffuse (diffuse cytoplasmic pattern)

Une fluorescence très fine, dense, granulaire ou homogène ou une image ressemblant à un nuage couvrant des parties du cytoplasme. Pas de coloration du noyau, mais les nucléoles peuvent présenter une coloration homogène, si les anticorps sont dirigés contre les protéines ribosomiques ARN (en anglais ribosomal RNA proteins), dont les précurseurs sont localisés dans les nucléoles. Le matériel chromosomique est négatif dans les cellules en métaphase.

4.5.3 Image mitochondriale (mitochondrial like pattern)

Gros granules de forme irrégulière, formant un réseau réticulaire qui s'étend du noyau jusque dans le cytoplasme. Le groupe ou cluster d'antigène M2 principalement reconnu est constitué de 4 protéines mitochondriales de la membrane interne des mitochondries. Les noyaux et les nucléoles sont négatifs, mais les sérums avec un titre élevé d'anticorps peuvent donner l'impression d'une coloration nucléaire mouchetée.

4.5.4 Lysosomes (lysosomal like pattern)

Fluorescence irrégulière entre les grands organites répartie sur le cytoplasme. Cela peut être provoqué par des anticorps dirigés contre les petits organites comme les lysosomes ou peroxysomes. Pas de coloration du noyau, mais coloration diffuse du cytoplasme pour les cellules en phase de division.

4.5.5 Golgi (Golgi like pattern)

Coloration des organites polaires proches du noyau et composée de gros granules irréguliers.

Les noyaux et les nucléoles sont négatifs. Coloration diffuse du cytoplasme pour les cellules en phase de division et accentuée autour du matériel chromosomique.

4.5.6 Actine (actin like pattern)

Coloration des fibres de stress situées juste en dessous de la membrane plasmique. Les noyaux, les nucléoles et les chromosomes en métaphase sont négatifs. Les câbles d'actine proches de la membrane plasmique s'étendent sur toute la longueur de la cellule. On peut également observer une extension dendritique sur la membrane des cellules.

4.5.7 Vimentine (vimentin like pattern)

Grande quantité de fins filaments s'étendant sur tout le cytoplasme et colorant un réseau de fibres radial. On observe également une coloration d'agrégats de fibres qui s'enroulent autour

du noyau, ce motif ayant la forme d'une spirale. Les noyaux et les nucléoles sont négatifs.

4.6 Négatif

4.6.1 Exemple 1:

Le cytoplasme ou les noyaux ne présentent presque pas de fluorescence verte. Des spots verts isolés et souvent irréguliers apparaissant dans le champ peuvent représenter des agrégats du conjugué. Les structures cellulaires peuvent avoir un aspect brunâtre (p. ex. les nucléoles), surtout quand on utilise de vieilles préparations ou des préparations qui ont été conservées avec des agents anti-décoloration. Les débris cellulaires peuvent également provoquer une fluorescence verte artéfactuelle.

4.6.2 Exemple 2:

On observe une fluorescence verdâtre très mate du noyau et/ou du cytoplasme, dont l'intensité se situe en dessous de celle d'un échantillon faiblement positif. La meilleure façon d'évaluer ce genre d'échantillon est de réaliser, lors de la procédure du test quotidienne, des contrôles avec un sérum faiblement positif, un sérum négatif et un sérum fortement positif en ce qui concerne les ANA.

4.7 Indéterminable

Tout autre motif relatif aux organites sous-cellulaires ou aux structures qui ne sont pas encore intégrés dans la taxonomie de classification.

4.8 Annexes

Les laboratoires qui utilisent des sections de cryostat (p. ex. foie ou rein de rongeurs) pour le diagnostic des ANA, ne peuvent pas saisir les motifs fluorescents suivants: image nucléaire mouchetée pléomorphique (pleomorphic speckled nuclear pattern), motif centromérique, points nucléaires multiples (multiple nuclear dots), points nucléaires (coiled body pattern), certaines images nucléolaires et la plupart des images cytoplasmiques. Les images du fuseau (spindle apparatus patterns) ne sont pas reconnues elles non plus. Les images mitochondriales peuvent être reconnues sur la plupart des tissus comme des mouchetures grossières (coarse speckled pattern) détectées auparavant sur une coupe de tissus de rein animal. Une légère fluorescence de la membrane nucléaire (smooth membranous nuclear pattern) apparaît souvent très clairement sur des coupes de foie de rat. La valeur seuil pour des ANA positifs sur des cellules HEp2 se situe normalement au-dessus de 1:100, alors qu'elle est généralement en dessous quand on utilise des coupes de tissus.

Un sérum présente souvent plusieurs motifs fluorescents différents, p. ex. des points nucléaires multiples avec une image mitochondriale (ces deux motifs sont caractéristiques pour la cirrhose biliaire primaire) et une image nucléaire mouchetée pléomorphique (pleomorphic speckled nuclear pattern) accompagnée d'une fluorescence nucléaire homogène, de mouchetures grossières ou de mouchetures fines (ces motifs sont caractéristiques pour le lupus érythémateux systémique). De même, un motif centromérique apparaît souvent avec une image mitochondriale.

Il faut indiquer que certains laboratoires et tests utilisent des conjugués FITC, qui sont dirigés contre toutes les classes d'immunoglobuline. Le glossaire présent se base sur les résultats pour les conjugués IgG spécifiques.

5. CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DE RENDEMENT

Cent trente huit échantillons congelés ont été testés sur deux lots de réactifs provenant d'une autre société et sur deux lots AESKUSLIDES. Les 118 échantillons cliniques ont été conservés pendant plusieurs années et représentaient des patients ayant fait l'objet d'une recherche de maladie rhumatique. Vingt échantillons supplémentaires recueillis lors d'un salon de la santé ont été intégrés à ce test. Les échantillons issus du salon de la santé représentaient une population ne présentant aucun symptôme clinique connu de maladie rhumatique. La comparaison des deux kits visait à démontrer une équivalence entre les systèmes ANA HEp-2 proposés par deux sociétés indépendantes, notamment en termes de cohérence des motifs.

a. Tableau 1 : Ensemble de données combinées des intervalles de confiance

		Prédicat		
		Positif	Négatif	Total
ANA HEp-2 AESKUSLIDES	Positif	116	0	116
	Négatif	0	22	22
	Total	116	22	138

% de concordance positive = 116/116 = 100 % (95^{e} % IC : 96.8 - 100%)
% de concordance négative = 22/22 = 100 % (95^{e} % IC : 85.1 - 100%)

b. Tableau 2 : Comparaison des motifs des ensembles de données combinées entre le prédicat et Aesku

Motif	n	Prédicat	AESKUSLIDES
Homogène	32	32	32
Tacheté	82	82	82
Nucléolaire	20	20	20
Centromère	6	6	6
Périphérique	3	3	3
Membrane nucléaire	1	1	1

N =144[2]

Les échantillons cliniques représentaient un spectre complet de maladies auto-immunes, notamment le LED, la sclérodermie, la sclérodermie de type CREST, le syndrome de Sjögren, la connectivite mixte, le syndrome des antiphospholipides, la polyarthrite rhumatoïde, la polymyosite/dermatomyosite, le LED médicamenteux, etc.

5.1 Reproductibilité et précision

Trois LOTS d'AESKUSLIDES différents ont été testés avec 15 échantillons de sérum regroupant l'ensemble complet de motifs. Ces échantillons ont été dilués entre 1:40 et 1:10240 et chaque dilution a été analysée par deux lecteurs indépendants sur les trois LOTS. Les critères d'acceptation consistaient en un écart de +/- 1 d'intensité de fluorescence. Les critères d'acceptation ont été remplis pour tous les échantillons, dilutions, LOTS et lecteurs indépendants.

Des données plus précises sont disponibles sur demande.

[2] La divergence entre la valeur N=138 du Tableau 1 et la valeur N=144 du Tableau 2 s'explique par l'absence de motif sur certains échantillons (par exemple, l'échantillon n° 5) et la présence de deux motifs sur d'autres échantillons (par exemple, l'échantillon n° 2). Le Tableau 2 indique uniquement le nombre de motifs.

6. FICHE D'INTERPRÉTATION DES DONNÉES

ANA-HEp-2

Date :	Lot :
Lame nº :	Opérateur:

N° de puits	ID	Facteur de dilution	Indice de fluorescence	Chromosomes (mitose)	Nucléoplasme	Nucléole	Cytoplasme	Auto-anticorps	Commentaires
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									

7. CONTENU DU KIT STANDARD

7.1 KITS STANDARDS

		LAMES (50 dans chaque kit)			CONJUGUÉ (3x 7,5 mL)		CONTRÔLE POSITIF (1x 0,5 mL)	
Réf. du kit	**Description du kit**	**Réf.**	**Puits**	**Revêtement**	**Réf.**	**Description**	**Réf.**	**Description**
51.100.Bulk5	ANA-HEp-2 (12 puits)	s51.100	12	Cellules d'ANA-Hep-2	C51.100.Bulk	**IgG** Capuchon bleu : solution légèrement bleue. Contenu : BSA, anticorps antihumains marqués à la fluorescéine (FITC)	PC51.100	Contrôle du motif ANA (homogène) Capuchon rouge : solution incolore. Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium < 0,1 % (conservateur)
51.101.Bulk5	ANA-HEp-2 (12 puits)				C51.101.Bulk	**IgG** Capuchon bleu : solution légèrement bleue. Contenu : BSA, anticorps antihumains marqués à la fluorescéine (FITC) (H+L)	PC51.101	Contrôle du motif ANA (homogène) Capuchon rouge : solution incolore. Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium < 0,1 % (conservateur), (H+L)

REMARQUE : Les autres composants des kits, notamment les réactifs communs (contrôles négatifs, milieu de montage, etc.) sont décrits ci-dessous, dans la section 8 RÉACTIFS COMMUNS.

8. RÉACTIFS COMMUNS

a. Réactifs communs

Quantité	Réf.	Réactif	Volume	Description	Prêt à l'emploi
1x	**NCIFA**	Contrôle négatif	0.5ml	Capuchon vert : solution incolore. Contenu : sérum humain (dilué), azoture de sodium < 0,1 % (conservateur)	OUI
1x	*** EBIFA**	Bleu d'Evans 0,2 %	1.5ml	Capuchon banc : solution bleue Contenu : PBS, bleu d'Evans. Diluer le bleu d'Evans 0,2 % selon une proportion 1:3000 dans 1 WBIFA	NON
3x	**MMIFA.Bulk**	Milieu de montage	12ml	Validé pour une utilisation avec HELMED® Capuchon banc : solution incolore Contenu : PBS, glycérine.	OUI
3x	**WBIFA**	Tampon de Lavage (10x)	100ml	Capuchon banc : solution incolore Diluer le tampon concentré selon une proportion 1:10 dans de l'eau distillée (par ex. 100 mL + 900 mL). Contenu : PBS, azoture de de sodium (conservateur).	NON
3x	**SBIFA**	Tampon de Echantillons (1x)	70ml	Capuchon banc : solution incolore pour la dilution des sérums de patients Contenu : PBS, BSA, azoture de de sodium (conservateur).	OUI

Les quantités sont indiquées par kit. (*)doivent être commandés séparément.

b. Matériel nécessaire mais non fourni

1. Eau distillée
2. Tubes à essai pour la dilution des échantillons
3. Fiole jaugée
4. Pipette volumétrique
5. Minuteur
6. Microscope à fluorescence doté d'un système FITC (filtre d'excitation à 490 nm, filtre écran à 510 nm)
7. Plateau d'incubation
8. Cuve de coloration
9. Pointes de pipetage
10. Lames couvre-objet (24x60 mm)
11. presser pissette

Si les informations sur le produit, y compris l'étiquetage, sont défectueuses ou incorrectes, contacter le fabricant ou le fournisseur du kit de test.

9. STOCKAGE ET DURÉE DE CONSERVATION

Conserver tous les réactifs à une température de 2-8 °C / 35-46 °F, à l'abri de la lumière intense. La date de péremption de chaque composant est indiquée sur l'étiquette correspondante. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.

Conserver tous les réactifs et les lames à une température de 2-8 %C / 35-46 °F, dans leurs conteneurs d'origine. Une fois préparées, les solutions reconstituées sont stables pendant 1 semaine à une température de 2-8 °C / 35-46 °F. **Les réactifs et les lames doivent être utilisés avant la date de péremption indiquée sur chaque composant**.

10. PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

a. Données relatives aux risques pour la santé

CE PRODUIT EST EXCLUSIVEMENT RESERVE A UN USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO. Seul un personnel qualifié et spécialement formé dans le domaine du diagnostic in vitro peut utiliser ce kit. Bien que les réactifs contenus dans ce kit ne soient pas considérés toxiques ou dangereux pour la santé si les conditions d'usage sont respectées, les recommandations et précautions suivantes doivent être observées pour la sécurité maximale de l'utilisateur:

Recommandations et précautions

Ce kit contient des composants potentiellement dangereux. Bien que les réactifs du kit ne soient pas classé comme irritants pour les yeux et la peau, il est recommandé d'éviter tout contact avec les yeux et la peau et de porter des gants jetables.

Toutes les substances d'origine humaine utilisées dans certains réactifs de ce kit (contrôles, par exemple) ont été analysées avec des méthodes homologuées et les résultats ont montré qu'elles étaient négatives en ce qui concerne l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs), le virus de l'hépatite C et le VIH. Toutefois, aucun test ne peut garantir l'absence complète d'agents viraux dans ces substances. Par conséquent, il est nécessaire de manipuler les contrôles du kit et les échantillons de patients comme s'il s'agissait de transmetteurs potentiels de maladies infectieuses et conformément aux conditions requises au niveau national.

Le kit de cet essai contient du matériel d'origine animale (BSA, immunoglobuline) comme l'indique le chapitre „contenu du kit", veuillez l'utiliser conformément aux conditions requises au niveau national.

b. Règles générales pour l'utilisation

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer pendant le travail avec ce kit.
2. Ne pas mélanger ou substituer des réactifs ou lames de lots différents. Cela pourrait conduire à une variation des résultats.
3. Bien refermer tous les flacons après l'emploi pour éviter les contaminations bactériennes.
4. Toujours pipeter chaque composant avec des nouveaux embouts stériles.
5. Ne jamais exposer les composants de ce kit à une température supérieure à 37°C / 98,6°F.
6. Toujours veiller à ce que les lames ne sèchent pas tout au long du déroulement de ce test.
7. Ne jamais congeler les lames!

Chaque laboratoire devrait établir son propre domaine normal basé sur ses propres techniques, contrôles, équipement et population de patients selon ses propres procédures établies.

Un diagnostic clinique définitif ne doit pas être basé uniquement sur les résultats de

l'essai réalisé, mais il doit être élaboré par le médecin après avoir évalué tous les résultats cliniques et des laboratoires.

Si les résultats de l'essai ne se trouvent pas dans la plage de valeurs acceptables définie par le matériel de contrôle, le test n'est pas valable et doit être répété. Veuillez vérifier les éléments suivants : la date de péremption des réactifs (employés), les conditions de stockage, les pipettes et autre matériel utilisé, le photomètre, les temps d'incubation et la méthode de lavage.

Si vous n'avez pas décelé d'erreur lors de la vérification des éléments cités ci-dessus, veuillez contacter le fabricant ou le fournisseur du kit.

11. RECUEIL D'ÉCHANTILLONS, MANIPULATION ET STOCKAGE

Utiliser de préférence des échantillons de sérum frais ou récemment prélevés. L'extraction de sang doit être conforme aux conditions requises au niveau national. Prélever les échantillons de sang de manière aseptique.

Ne pas utiliser d'échantillons lipémiques, ictériques, hémolysés ou contaminés par des bactéries.

Les sérums avec des particules doivent être purifiés par centrifugation à basse vitesse (<1000 x g). Les échantillons de sang doivent être recueillis dans des tubes propres, secs et vides. Après la séparation, les échantillons de sérum doivent être utilisés dans les 8 heures. Ils peuvent être stockés jusqu'à 48 heures bien fermés à une température comprise entre 2 et 8°C / 35 et 46°F ou congelés à -20 °C / -4 °F pour les périodes plus longues. Éviter les congélations et décongélations répétées.

12. PROCÉDURE DU TEST

a. Préparation

Amener tous les composants à température ambiante (20-26°C) avant usage et bien les mélanger. Respecter le temps d'incubation recommandé pour chaque composant afin d'obtenir un résultat optimal.

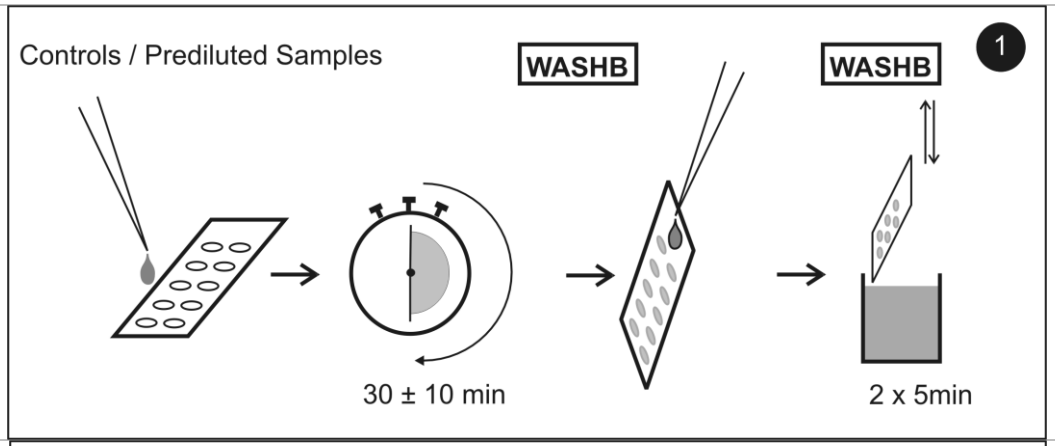
1. Préparation de Tampon de Lavage: diluer le tampon concentré à 1:10 avec de l'eau distillée.
2. Dilution des échantillons : diluer le sérum du patient (pour la concentration de dépistage, se reporter à la section ***Procédure de test avec le kit*** ci-dessus en fonction de la référence de produit utilisé) avec un tampon d'échantillon 1x. Les concentrations des kits HEp-2, nDNA, rLKS, EMA, etc. sont différentes.
3. Les contrôles sont prêts à l'emploi.
4. Élaborer un protocole : les fiches d'interprétation des données sont disponibles dans la section ***Procédure de test avec le kit*** en fonction de la référence de produit utilisée.

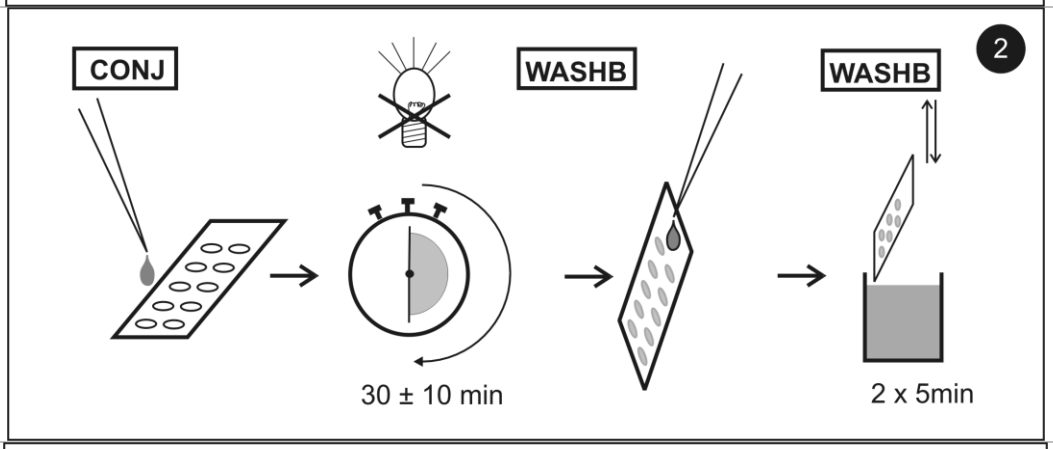
b. Réalisation du test

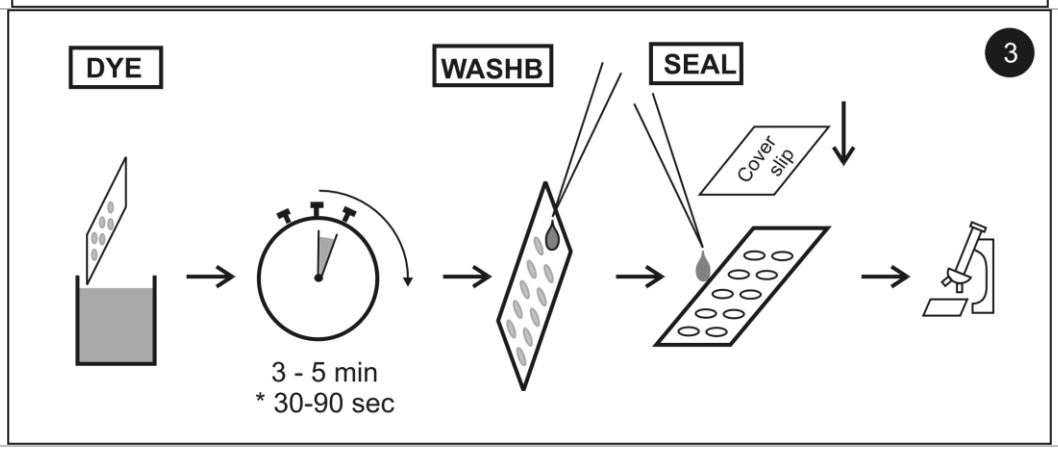
N°	Description des étapes
1.	Compter le nombre de lames qu'il faudra pour réaliser le test. Retirer les lames nécessaires de leur emballage de protection et les marquer à l'aide d'un crayon. Éviter de toucher les puits. Veiller à ce que les lames ne sèchent pas tout au long du déroulement du test.
2.	**Préparation du Plateau d'incubation:** Placez un petit volume d'eau déminéralisée ou déionisée dans un plateau d'incubateur et placez la lame(s) sur les supports dans le plateau d'incubateur. Incuber les lames 30 ± 10 minutes à température ambiante dans le plateau d'incubation humide. Utiliser des temps d'incubation du conjugué cohérents. **Première incubation:** Pipeter une quantité suffisante de chaque sérum dilué et de contrôles (prêts à l'emploi) dans les puits appropriés ; éviter tout contact direct de la pipette avec la surface de la lame. Éviter un contact direct de l'embout de la pipette avec la surface de la lame. S'assurer que chaque puits est complètement recouvert avec le sérum correspondant ou le contrôle. Pour cela, il est important d'utiliser autant de matériel qu'il sera nécessaire. Mais éviter le débordement des échantillons de sérum entre les puits, car cela peut fausser les résultats.
3.	**Lavage :** Après incubation, retirer les lames du plateau d'incubation et rincer brièvement avec le tampon de lavage en utilisant une bouteille de lavage à pression. Ne pas injecter de tampon directement sur les puits. NOTEZ : Afin de prévenir les contaminations croisées incliner d'abord les lames sur un côté, puis appliquer un courant de tampon de lavage délicatement le long du milieu de la lame. Puis incliner la lame sur l'autre côté et répéter cette procédure de lavage. Laver les lames 10 minutes avec les tampon de lavage dans un bac de marquage de lames. Eviter tout contact d'élements solides avec le substrat. Pour un résultat optimal changer la solution de tampon après 5 minutes. Retirer les lames du bac et retirer délicatement l'excès de tampon de lavage. NOTEZ : Il est important que les puits des lames de s'assèchent pas durant la procédure car cela peut endommager le substrat. Merci de ne pas sécher la lame ou la laisser sans réactif fluorescent plus de quelques secondes.
4.	**Deuxième incubation**: Après le lavage, remettre immédiatement la lame dans la chambre humide et recouvrir chaque puits avec 30 µl de conjugué FITC prêt à l'emploi. Incuber les lames 30 ± 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité
5.	**Lavage:** Après incubation, retirer les lames du plateau d'incubation et rincer brièvement avec le tampon de lavage en utilisant une bouteille de lavage à pression. Ne pas injecter de tampon directement sur les puits.Laver les lames 10 minutes avec les tampon de lavage dans un bac de marquage de lames. Pour un résultat optimal changer la solution de tampon après 5 minutes.
6.	***Contre-coloration facultative :** Diluer le contre-colorant (Bleu d'Evans) dans une proportion 1:3000 dans le tampon de lavage et bien mélanger. Incliner le contre-colorant dans le bac de coloration et incuber les lames dedans. Se reporter à la section ***Procédure de test avec le kit*** ci-dessus en fonction de la référence produit utilisée pour obtenir des détails sur la durée de l'incubation. Le Bleu d'Evans couvre une fluorescence de fond non spécifique.

	Après le temps d'incubation, retirer la lame et la rincer brièvement avec la solution de lavage. Éliminer les excès de solution de lavage avec précaution. Ne pas sécher les lames avec du papier absorbant. Les lames ne doivent jamais se dessécher.
7.	**Montage**: Mettre une quantité suffisante de liquide de montage (mounting medium) le long de la ligne médiane de la lame. Faire glisser avec précaution la lamelle couvre-objet sur le liquide de montage en évitant la formation de bulles d'air.
8.	**Lecture au microscope**: Lire immédiatement la lame à l'aide d'un microscope à fluorescence avec un agrandissement de 400 à 800 fois (filtre d'excitation de 490 nm, filtre barrière de 510 nm).

c. Procédure

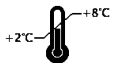






13. DÉPANNAGE

ERREUR	CAUSES POSSIBLES	SOLUTION
Faible densité des cellules	Lyse des cellules due au contact avec de l'eau déionisée	Respecter les conditions de lavage recommandées
	Tampon éclaboussé directement sur les cellules	Désactiver le sérum
Fluorescence irrégulière	Le sérum a séché dans les puits, la fluorescence est plus forte sur les bords	Toujours incuber dans un environnement humide
	sérum ne recouvre pas le puits	Utiliser un volume suffisant de matériel du test
	Réactions croisées entre les puits	Éviter un débordement des échantillons entre les puits lors de la première incubation
	Le marquage d'une lame avec un crayon de cire produit un film	Utiliser un crayon de papier
	Microscope mal ajusté	Vérifier le réglage Vérifier la durée de vie de la lampe UV
Image diffuse	Lame conservée au réfrigérateur sans couvercle	Sceller la lamelle couvre-objet avec du vernis à ongles ou de la cire de paraffine
	Microscope I.F. sali. Rayures/ éraflures possibles sur la lentille	Nettoyer le microscope conformément au mode d'emploi
Faible fluorescence ou pas de fluorescence	Conjugué et lame congelés et décongelés	Conserver les conjugués et les lames à 2-8°C/35-46°F
	Les contrôles ont été dilués	Vérifier le mode d'emploi, utiliser les contrôles du kit qui sont prêts à l'emploi
	ontamination bactérienne des sérums ou conjugués - Microscope pas ajusté - Le pH de la solution de lavage est trop faible (pH: 7.4 ± 0.2)	Vérifier les conditions
	- Conjugué FITC exposé à la lumière	Conserver le conjugué à l'abri de la lumière
Fluorescence de fond (background fluorescence)	- Mauvais lavage - La lame a séché - Sérums lipémiques, hémolysés - Erreur au niveau du microscope	-Vérifier les instructions de lavage -Ne jamais laisser sécher les lames -Utiliser des sérums frais -Vérifier les filtres / l'objectif

IVD	- Diagnosi in vitro	- For in vitro diagnostic use
	- Pour diagnostic in vitro	- Para uso diagnóstico in vitro
	- In Vitro Diagnostikum	- In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	- Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	¨ Numero d'ordine	¨ Cataloge number
	¨ Référence Catalogue	¨ Numéro de catálogo
	¨ Bestellnummer	¨ Αριθμός παραγγελίας
	¨ Número de catálogo	
LOT	¨ Descrizione lotto	¨ Lot
	¨ Lot	¨ Lote
	¨ Chargen Bezeichnung	¨ Χαρακτηρισμός παρτίδας
	¨ Lote	
CE	¨ Conformità europea	¨ EC Declaration of Conformity
	¨ Déclaration CE de Conformité	¨ Declaración CE de Conformidad
	¨ Europäische Konformität	¨ Ευρωπαϊκή συμφωνία
	¨ Déclaracão CE de Conformidade	
	¨ Rispettare le istruzioni per l'uso	¨ See instructions for use
	¨ Voir les instructions d'utilisation	¨ Ver las instrucciones de uso
	¨ Gebrauchsanweisung beachten	¨ Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	¨ Ver as instrucões de uso	
	¨ Da utilizzarsi entro	¨ Use by
	¨ Utilise avant le	¨ Utilizar antes de
	¨ Verwendbar bis	¨ Χρήση μέχρι
	¨ Utilizar antes de	
	¨ Conservare a 2-8°C	¨ Store at 2-8°C (35-46°F)
	¨ Conserver à 2-8°C	¨ Conservar a 2-8°C
	¨ Lagerung bei 2-8°C	¨ Φυλάσσεται στους 2-8°C
	¨ Conservar entre 2-8°C	
	¨ Prodotto da	¨ Manufactured by
	¨ Fabriqué par	¨ Fabricado por
	¨ Hergestellt von	¨ Κατασκευάζεται από
	¨ Fabricado por	
DYE	¨ Colorante Blue-Evans	¨ Evans-Blue Dye
	¨ coloration au Bleu Evans	¨ Colorante Azul de Evans
	¨ Evans-Blue Färbelösung	¨ Evans Blue
	¨ Evans Blue	
CONTROL +	¨ Controllo positivo	¨ Positive Control
	¨ Contrôle Positif	¨ Control Positivo
	¨ Positiv Kontrolle	¨ Θετικός ορός ελέγχου
	¨ Controlo positivo	
CONTROL −	¨ Controllo negativo	¨ Negative Control
	¨ Contrôle Négatif	¨ Control Negativo
	¨ Negativ Kontrolle	¨ Αρνητικός ορός ελέγχου
	¨ Controlo negativo	
SEAL	¨ Mezzi di montaggio	¨ Mounting media
	¨ milieu de montage	¨ Medio de montaje
	¨ Mounting Medium	¨ Μέσο μονιμοποίησης
	¨ Meio de montagem	
CONJ	¨ Coniugato	¨ Conjugate
	¨ Conjugé	¨ Conjugado
	¨ Konjugat	¨ Σύζευγμα
	¨ Conjugado	
	¨ Vetrino per microscopio	¨ Microscope slide
	¨ lame de microscope	¨ Portaobjetos
	¨ Objektträger	¨ Αντικειμενοφόρο πλακίδιο
	¨ Lâmina	
WASHB 10x	¨ Tampone di lavaggio	¨ Wash Buffer
	¨ Tampon de Lavage	¨ Solucão de lavagem
	¨ Waschpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	¨ Solución de lavado	
SB 1x	¨ Tampone di campione	¨ Sample Buffer
	¨ Tampon de Echantillons	¨ Solucão de Muestras
	¨ Probenpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	¨ Solución de Muestras	
Σ XX	¨ XX determinazioni	¨ XX tests
	¨ XX tests	¨ XX pruebas
	¨ XX Bestimmungen	¨ XX προσδιορισμοί
	¨ XX Testes	