

Fiche Technique Test d'IFI BIOGNOST®

CE

Détection des ANTICORPS IgG, IgM et IgA par IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE dans les sérums humains

Durée du test: environ 90–120 min

EMPLOI DU TEST CONFORMEMENT AUX INSTRUCTIONS

Le test d'IFI Biognost® est un test d'immunofluorescence indirecte pour la détection qualitative et sémi-quantitative des anticorps dans les sérums humains. Le test d'IFI Biognost® est destiné au diagnostic in vitro.

PRINCIPE DU TEST

Le test s'appuie sur la méthode classique de l'immunofluorescence indirecte. Les lames de substrat sont couvertes de l'antigène.

Dans une première étape, le sérum du patient est appliqué sur les puits de la lame et incubé. Si le sérum contient des anticorps dirigés contre l'antigène, ces anticorps se lient au substrat. Les anticorps non spécifiques ainsi que les autres protéines et composants présents dans le sérum sont éliminés lors d'une étape de lavage. Pour éviter que les antigènes ne soient altérés ou ne se détachent de la lame, il est absolument déconseillé de remuer le tampon lors du lavage. Au cours d'une deuxième étape d'incubation, les anticorps liés au substrat font l'objet d'un marquage optique par des immunoglobulines anti-humaines marquées FITC (le conjugué). Pour éliminer l'excès du conjugué, la lame sera de nouveau lavée. Le complexe antigène/anticorps humains/conjugué peut alors être examiné au microscope à fluorescence au grossissement 400-500.

Les sérums destinés à la recherche des IgM ou IgA sont soumis à un réactif d'absorption d'IgG et de facteurs rhumatoïdes (Biosorb®), ceci avant la première étape du test.

LIMITES DE LA METHODE

Les tests basés sur la technique d'immunofluorescence indirecte conviennent à la détection qualitative des anticorps dirigés contre les antigènes fixés sur les lames. Comme l'affinité des anticorps provenant de différents patients peut varier considérablement, le titre pour un patient ne correspond pas automatiquement à la gravité de sa maladie. C'est la raison pour laquelle la standardisation des résultats pose problème. Par contre, les tests d'immunofluorescence indirecte sont de bons tests de dépistage, car ce „désavantage“ de la présence optimale de la gamme d'antigènes sur les lames représente le plus grand avantage de la méthode. Dans ce contexte, l'utilisation des témoins positifs dont les titres limites sont connus permet une interprétation sémi-quantitative des tests.

Emettre un diagnostic d'après un seul test est délicat, et l'on doit toujours considérer le contexte clinique du patient (symptômes, date du prélèvement de l'échantillon, d'autres résultats de laboratoire, fabricant du test, bande de référence interne du laboratoire).

REACTIFS BIOGNOST®

Les tests diagnostiques Biognost® sont disponibles comme kits ou réactifs individuels:

Lames de substrat: couvertes des antigènes correspondants.

Témoin positif: sérum humain stabilisé, contient des anticorps dirigés contre l'antigène correspondant, prêt à l'emploi.

Témoin négatif: sérum humain stabilisé, sans anticorps (IgG, IgM, IgA) détectables en immunofluorescence, prêt à l'emploi.

Conjugué: anti-immunoglobulines humaines, mono- ou polyvalent, avec ou sans bleu d'Evans comme contre-colorant, solution prête à l'emploi ou concentrée; la dilution de dépistage est indiquée sur l'étiquette.

Tampon PBS: tampon PBS en poudre qui se dissout facilement, suffisant pour la préparation de 500 ou 1000 ml de solution de tampon PBS; contient 10 mM de phosphate de sodium, 150 mM de chlorure de sodium, pH 7,5.

Milieu de montage, pochoirs absorbants, lamelles, fiche technique.

MATERIELS ET EQUIPEMENTS AUXILIAIRES QUI NE SONT PAS FOURNIS

Tubes pour la préparation des dilutions des échantillons

Pipettes de précision (intervalle 1-1000 µl)

Agitateur type „Vortex“

Récipient gradué (500 ou 1000 ml) pour la préparation du tampon PBS

Eau distillée ou déminéralisée

Chambre humide d'incubation

Etuve (37° C)

Cuvettes de lavage pour les lames (aussi grandes que possible)

Bouteille de polyéthylène à pissette pour le tampon PBS

Chronomètre

Microscope à fluorescence fond noir au filtres permettant une excitation de 450-490 nm et une émission de 560-590 nm (A utiliser sans huile d'immersion!). Pour une sensibilité maximale, utiliser de préférence un épimicroscope plutôt qu'un microscope de translucidance.

STOCKAGE ET CONSERVATION

Les lames, les témoins, les conjugués ainsi que Biosorb® se conservent exclusivement à la température indiquée sur l'étiquette (5-10° C ou ≤ -20° C). Pour éviter le dessèchement et la dénaturation des substrats, les lames doivent, par ailleurs, être conservées dans les pochettes d'aluminium bien fermées et imperméables à l'air. Si les recommandations indiquées sur les étiquettes sont bien respectées, les témoins, les conjugués et les lames se conservent jusqu'à la date de péremption figurant sur l'emballage. N'utilisez jamais de réactifs péremptés! La conservation du tampon PBS en poudre n'est pas limitée dans le temps à condition qu'il soit gardé dans des pochettes imperméables à l'air et à température ambiante ou une température inférieure. Le milieu de montage, les pochoirs absorbants et les lamelles se conservent également sans limites si leur stockage à température ambiante ou une température inférieure est garanti. Comme le tampon PBS ne contient pas de conservateur, il est conseillé d'utiliser les solutions de tampon PBS (pH 7,5) le jour même de leur préparation. Pour une utilisation le lendemain, elles seront entretemps gardées à 5-10° C dans un récipient bien fermé. Toute solution PBS à l'état trouble, floconné, coloré ou dont le pH est modifié doit être rejetée.

INSTRUCTIONS DE SECURITE

1. Tous les sérums humains qui ont été utilisés à la préparation des réactifs à base de sérums humains (témoins) ont fait l'objet d'une recherche d'antigènes HBs et d'anticorps dirigés contre le virus HIV dont le résultat s'est avéré négatif. Toutefois, dans la mesure où un caractère infectieux ne peut jamais être exclu à 100 %, leur manipulation nécessite de prendre les précautions appropriées.
2. Les témoins, les conjugués et le milieu de montage contiennent 0.09% d'azide de sodium. L'azide de sodium est toxique. Evitez l'avalément ainsi que tout contact avec la peau et les muqueuses! De plus, à cause du danger de la formation de substances explosives, les réactifs contenant de l'azide de sodium ne doivent pas être mis en contact avec des objets qui contiennent du cuivre et ou du plomb.
3. Pour une contre-coloration, on peut ajouter le colorant bleu d'Evans au tampon de lavage. Le bleu d'Evans est potentiellement cancérigène et représente une toxine de la classe 1* selon la classification suisse des substances toxiques. Pour cette raison, il est conseillé d'éviter l'avalément du tampon de lavage ainsi que tout contact avec la peau.
4. Les consignes de sécurité de la caisse de prévoyance des accidents au travail ainsi que des laboratoires des instituts en question concernant les substances toxiques, irritantes et de danger biologique sont à respecter strictement (voir les affiches, le journal du laboratoire, les instructions de sécurité ainsi que les consignes résultant de l'accréditation de l'établissement).
5. Il est recommandé de respecter les directives actuelles définies par „GBEA“ (Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale).
6. Tous les sérums et matériels utilisés dans le test doivent être éliminés selon la législation en vigueur.

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biostik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® and Recipe® are registered trademarks of Bios® GmbH, Germany

Die mit ® gekennzeichneten Warenzeichen in diesem Text sind Eigentum der Fa. Bios GmbH.

Die Gebrauchsinformationen der Firma Bios Labordiagnostik GmbH sind geistiges Eigentum der Fa. Bios und nur nach den Vorgaben der Firma Bios zu verwenden.

Bios® Labordiagnostik GmbH, Hofmannstr. 7, D-81379 München,

Fon/Fax: +49 89/898895-41/40, e-mail: bios@bios-world.com

TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Le test convient à l'analyse d'échantillons de sérum ou de plasma. A 5-10° C, la conservation du sérum/plasma est de 24 à 48 heures. Pour permettre un stockage plus long ou des analyses répétées, les sérums/plasmas devront être congelés choc par portions de > 50 µl dans de l'azote liquide. Une fois congelés, les échantillons se conservent à ≤ -20° C. Pour des portions de sérum ou de plasma plus grandes, éviter les cycles de congélation et de décongélation répétés, car ceci peut entraîner la formation d'agglomérats de protéines ainsi que la dégradation de composants du sérum/plasma. Au cas où les analyses prévues sont indifférentes à la présence d'azide (attention: ceci n'est pas le cas chez les tests ELISA de peroxidase!), le sérum/plasma se conserve également au réfrigérateur après l'adjonction de 0.09 % d'azide. Normalement, dans ces conditions, le sérum/plasma se conserve à long termes (≥ 1 an) et sans pertes d'électrolytes.

La recherche des IgM et IgA nécessite de procéder à une séparation IgG/IgM du sérum du patient afin d'éviter tout effet perturbateur dû aux facteurs rhumatoïdes qui peuvent prétendre la présence des IgM et aux anticorps IgG qui peuvent entrer en compétition avec les IgM et IgA en les masquant. La séparation des différents types d'anticorps peut être réalisée à l'aide du système de séparation prêt à l'emploi Biosorb® qui est disponible chez la société Bios®. Bien que ce système soit optimisé pour la séparation IgG/IgM, il convient aussi à la préparation des échantillons destinés à la détection des IgA. A ce sujet, les anticorps IgG sont enlevés de l'échantillon tandis que les IgM ainsi que la plupart des anticorps IgA y persistent. Lors de l'étape de séparation, les échantillons sont dilués 1:5. En préparant les dilutions des échantillons pour la recherche des IgM et IgA, il faut tenir compte de cette dilution. Après l'étape de séparation, il est conseillé de procéder immédiatement à la préparation du test.

CONTROLE DE LA QUALITE ET SOURCES DE PERTURBATIONS

Pour tous les paramètres à rechercher, les témoins positifs et négatifs doivent être également contrôlés lors de chaque test. Si les témoins ne fournissent pas les résultats escomptés, le test n'est pas valable. En faisant le titrage des témoins positifs dont les titres limites souhaités sont indiqués sur les flacons tout utilisateur a la possibilité de vérifier lui-même le bon fonctionnement du test. Si, dans le laboratoire de l'utilisateur, le titre limite indiqué ne peut pas être reproduit (à +/- 1 à 2 degrés de dilution), il est à vérifier, si exclusivement des réactifs Biognost® (ou par exemple des lamelles ou du milieu de montage d'un autre fournisseur) ont été utilisés à la préparation du test. Assurez-vous aussi que la solution de tampon PBS Biognost® a été fraîchement préparée et contrôlez que le microscope à fluorescence est en ordre parfait (des sources possibles de perturbation consistent par exemple en des objectifs salis d'huile ou en une lampe trop faible ou mal ajustée). Par ailleurs, vérifiez, si toutes les recommandations de stockage des réactifs étaient bien respectées, si des composants déjà périmés ont été utilisés et si la chambre d'incubation était suffisamment humide pendant toute la durée du test. Vérifiez également, si les lames étaient faussement inscrites par un stylo feutre (au lieu d'un crayon à mine dure) etc. Avant de préparer les tests, évitez en tout cas d'accélérer le processus de chauffage des réactifs en utilisant des sources de chaleur! Toute liaison non-spécifique du conjugué au substrat qui perturbe ou falsifie les résultats d'un test peut être identifiée à l'aide d'un test blanc au tampon PBS. Pour préparer le test blanc, faire incuber du tampon PBS au lieu de témoins et de sérums pré-dilués sur un puits et procéder ensuite comme d'habitude aux étapes suivantes de la procédure.

PREPARATION DU TEST

Au cas où une solution de conjugué concentrée est employée, le conjugué doit être dilué avant la préparation du test avec du tampon PBS selon les indications sur l'étiquette.

Attention: Une fois dilué, le conjugué ne se conserve pas. Ne veuillez donc diluer que la quantité de conjugué nécessaire à la préparation d'un seul test.

MODE OPERATOIRE

Les lames, les témoins et les conjugués Biognost® sont prêts à l'emploi dès qu'ils ont atteint la température ambiante (après 5 minutes environ). Les témoins et les conjugués s'utilisent sans dilution préalable.

Pour de plus amples informations concernant l'utilisation de Biosorb® en tant que système de séparation IgG/IgM (IgG/IgA), voir la fiche technique de la Réf. S0001tif.

Les témoins Biognost® on fait l'objet de toutes les étapes nécessaires de séparation. Il est alors fortement déconseillé de les soumettre à d'autres manipulations comme par exemple des séparations IgG/IgM ou des absorptions.

Les lames de substrat Biognost® ont suivi une procédure de fixation et sont donc prêtes à l'emploi. Toute procédure de fixation supplémentaire peut entraîner la destruction des substrats.

Avant chaque test, les dilutions de dépistage et/ou de titrage des sérums doivent être préparées. Comme diluent, utiliser du tampon PBS ou du tampon PBS contenant 1 % d'albumine de sérum bovin.

Les dilutions appropriées de dépistage et de titrage peuvent être retirées de la fiche technique détaillée ou de la fiche des données techniques de chaque paramètre.

Avant la préparation du test, il est conseillé d'établir par écrit tous les tableaux de pipettage de la journée à l'aide d'un formulaire prévu à cet effet. Ce formulaire est indispensable à l'interprétation des résultats et assure leur documentation correcte.

1. Ouvrir la pochette d'aluminium des lames à l'aide de l'encoche prévue à cet effet et sortir avec précaution les lames, sans toucher les puits. Pour inscrire les lames, utiliser toujours un crayon à mine dure, ne jamais utiliser de crayons feutre pour écrire sur les lames.
2. Distribuer les témoins et les sérums de patients pré-dilués sur les puits de telle sorte que la surface des puits soit complètement couverte de liquide (selon la dimension des puits, il faut verser de 15 à 50 µl de témoin ou de sérum par puits).
3. Laisser incuber les lames en chambre humide:
Recherche des IgG et Ac polyspécifiques: 30 min à température ambiante
Recherche des IgM/IgA: 30 min à température ambiante
Recherche des IgM/IgA chez les pathogènes intracellulaires (virus, bactéries intracellulaires): 30 min à 37° C ou 60 min à températ. ambiante
Tenir les lames à l'abri des rayons directs de soleil et éviter la proximité de sources de chaleur.
4. Sortir les lames de la chambre humide et les rincer avec précaution à l'aide d'une bouteille à pissette remplie de PBS (ne jamais diriger le jet de la pissette directement sur les puits!)
5. Laisser tremper les lames 2x 5 minutes dans un bain de tampon PBS qui sera changé la deuxième fois; utiliser de grandes cuvettes de lavage et éviter d'agiter et de remuer le tampon lors du lavage.
6. Sortir les lames et bien les essuyer avec les pochoirs absorbants prévus à cet effet. L'antigène ne doit en aucun cas sécher. Il faut donc:
7. Distribuer au plus vite le conjugué approprié sur les puits de telle sorte que la surface des puits soit complètement couverte de liquide (selon la dimension des puits, il faut verser de 15 à 50 µl de conjugué par puits). Si les flacons compte-gouttes du conjugué Biognost® sont utilisés, une goutte correspond à environ 25 µl.
8. Laisser incuber les lames 30 min à température ambiante en chambre humide; mettre la chambre d'incubation à l'abri de la lumière et éviter la proximité de sources de chaleur.
9. Procéder ensuite à un nouveau lavage comme décrit aux points 4-6. Ne pas rincer les lames avec de l'eau distillée.
10. Distribuer immédiatement 2 à 3 petites gouttes de milieu de montage sur chaque lame et déposer les lamelles sur les lames en évitant la formation de bulles d'air. Si nécessaire, enlever des traces excédentaires de milieu de montage afin d'éviter que les lames collent au plateau du microscope ou au récipient où elles seront stockées. Pour la recherche de EBNA ainsi que des anticorps dirigés contre la gliadine, consulter les fiches des données particulières.

INTERPRETATION

Les préparations seront examinées au microscope à fluorescence au grossissement 400-500 (bande d'excitation des filtres 450-490 nm). (Un aperçu peut être obtenu au grossissement 100). Pour éviter la décoloration des préparations et obtenir des résultats fiables, examiner rapidement autant de champs visuels que possible et renoncer à examiner les champs visuels particuliers plus longtemps que ce que leur interprétation habituelle l'exige. Après la préparation des lames, il est conseillé de procéder immédiatement à l'examen des préparations au microscope. Si cela n'est pas possible, les lames doivent alors être gardées au frais et dans l'obscurité dans des classeurs à lames de telle manière qu'elles soient protégées contre le dessèchement.

L'interprétation du test exige que les témoins analysés avec les échantillons fournissent les résultats escomptés.

Pour de plus amples informations sur l'interprétation et l'évaluation des tests, consultez les fiches techniques détaillées.

Nous tenons à remarquer qu'en détectant des anticorps IgM en immunofluorescence on observe des motifs de fluorescence plus faibles par rapport aux motifs IgG. Les motifs de fluorescence IgM peuvent également varier selon le sérum utilisé à la préparation du témoin positif IgM. Le titrage des témoins IgM est souvent difficile,

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biostik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® and Recipe® are registered trademarks of Bios® GmbH, Germany

Die mit ® gekennzeichneten Warenzeichen in diesem Text sind Eigentum der Fa. Bios GmbH.

Die Gebrauchsinformationen der Firma Bios Labordiagnostik GmbH sind geistiges Eigentum der Fa. Bios und nur nach den Vorgaben der Firma Bios zu verwenden.

Bios® Labordiagnostik GmbH, Hofmannstr. 7, D-81379 München,

Fon/Fax: +49 89/898895-41/40, e-mail: bios@bios-world.com

parce que sur certains lots de substrat un témoin dont le titre limite 4 est indiqué sur le flacon ne montre qu'un résultat faiblement positif, même quand il est employé de façon non-diluée. Lors du titrage, des différences à 1 ou 2 degrés de dilution résultent pourtant de la méthode de l'immunofluorescence et doivent être acceptées (voir passage "Contrôle de la qualité et sources de perturbations").

Motifs de fluorescence:

Pour évaluer les tests, la fluorescence des structures tissulaires ou des pathogènes doit être examinée.

Positif:

La fluorescence spécifique se présente sous forme d'une coloration vert clair d'une intensité variable notée comme suit: 1+ (faible), 2+ (moyenne), 3+ (forte), 4+ (brillante).

Négatif:

Toutes fluorescences d'une intensité inférieure à 1+ sont considérées comme négatives. Les colorations jaunâtres où vert foncé doivent être ignorées, car elles sont le résultat des réactions non-spécifiques.

Titre:

Le titre limite est l'inverse de la plus forte dilution pour laquelle une fluorescence d'au moins 1+ peut encore s'observer. Exemple: Si la dilution 1:80 est encore considérée comme 1+ alors que la dilution 1:160 est négative, le titre est alors 80.

BIBLIOGRAPHIE

1. Weller T.H., Coons A.H.: Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varizella and Herpes Zoster Propagated in vitro. Proc. So. Exp. Bio. Med. 86, 1954, 789-794.
2. Riggs J.L., Siewald R.J., Downs C.M., Metcalf T.G.: Isothiocyanate Compounds as Fluorescent Labelling Agents for Immune Serum. Am. J. Pathol. 34, 1958, 1081-1097.