



A.MENARINI
diagnostics

TEST DE DETECTION DES ANTICORPS ANTI-KERATINE

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 38638 Anti-kératine (Oesophage de Rat) 48 Tests

REF 38070 Lamelle Anti-kératine (Oesophage de Rat) 6 Puits

Test par immunofluorescence indirecte pour la recherche et la détermination quantitative des anticorps anti-kératine (AKA) dans le sérum humain.

GENERALITES

L'arthrite rhumatoïde (RA) est la maladie rhumatismale la plus diffuse, affectant 1 à 2 % de la population. Elle est caractérisée par une infiltration de cellules mononucléaires et leur prolifération dans les cellules synoviales. La maladie consiste en une inflammation de la membrane et est suivie par une dégradation irréversible de la structure du cartilage et de l'os. La pathogenèse de la RA n'est pas connue, bien que cette maladie soit caractérisée par la présence de différents anticorps circulant tels que le facteur rhumatoïde (RF), les anticorps anti-kératine (AKA) et le facteur périmucléaire (APF). Le RF est présent chez 70 à 90% des patients souffrant de RA et est inclus dans la classification des critères ARA*.

Les anticorps anti-kératine, décrits pour la première fois par Young et ses collaborateurs¹, sont très spécifiques à la RA. Les AKA peuvent être détectés par immunofluorescence indirecte (IFA) sur des substrats d'oesophages de rat, avant même le développement des premiers symptômes aux articulations²⁻⁶. Ils se retrouvent dans environ 40% des patients souffrant de RA, dont 14% environ sont RF négatifs. L'association RF et AKA est très proche. Des complexes immunitaires circulant ont été retrouvés en concentrations beaucoup plus importantes chez les patients souffrant de RA et positifs aux AKA. Ceci pourrait expliquer l'association des AKA avec les formes les plus sévères de RA.

PRINCIPES DE LA METHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce kit, le sérum du patient est incubé sur des substrats d'oesophage de rat, ce qui permet la fixation des anticorps avec le substrat. Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué anti-IgG humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps de classe IgG fixés. Les réactions sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert pomme du stratum corneum de l'épithélium de la muqueuse démontre la présence d'anticorps AKA. Le titre du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé par dilutions sériques successives.

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs entre 2°et 8°C. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Avant utilisation, attendre que les réactifs atteignent l'équilibre à la température ambiante du laboratoire.

Matériel fourni

Menarini™ Anti-kératine (Oesophage de Rat) **REF** 38638

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 48 tests chacun.

8 x	SORB SLD 6	Lames 6 puits avec substrat d'oesophage de rat
1 x 0.5 ml	CONTROL + AKA *	Contrôle positif. Contient sérum humain avec BSA.
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Contrôle négatif. Contient sérum humain avec BSA.


 1 x 5 ml **IgG-CONJ** **FITC** **EB** *

Conjugué FITC anti-IgG humaines avec Coloration d'Evans, contient du BSA. Maintenir à l'abri de la lumière

 1 x 60 ml **BUF** *

Diluant sérum. Contient BSA.

 2 flacons **BUF** **WASH**
Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre.

 1 x 5.0 ml **MOUNTING** **MEDIUM** *

Milieu de montage. Ne pas congeler.

 1 x 12 **COVER** **SLD**
Lamelles couvre-lames.
Composants en option

 1 x 5 ml **IgG-CONJ** **FITC** *

REF 38009. Conjugué d'anticorps FITC pour l'IgG humain. Conserver à l'abri de la lumière.

 1 x 1,0 ml **EVANS**
REF 38014 Coloration de contraste Bleu Evans

 * Contient < 0.1% NaN₃
Symboles utilisés sur les étiquettes:
LOT Numéro de lot

 REF Numéro de référence catalogue

A utiliser avant

Température de conservation

Lire les instructions d'utilisation

IVD Pour usage diagnostique In vitro

Fabricant

Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Bac à coloration pour le lavage des lames (bac Coplin)
- Petits tubes (ex : 13 X 75 mm) et porte-tubes
- Eau distillée ou déionisée
- Eprovette graduée 1l
- Flacon pour solution de lavage
- Serviettes en papier
- Chambre d'incubation



MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage¹⁴.

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN_3). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit composants par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Éviter les congélations/décongélations successives des sérums.

MODE OPERATOIRE

A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:10 à l'aide du diluant échantillon fourni (0.1ml de sérum + 0.9ml de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des anticorps dans le cas où le dépistage serait positif.
2. Laisser les lames prendre la température du laboratoire pendant 10-15 minutes dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat
3. Numéroter les lames et les placer dans la chambre humidifiée avec des serviettes en papier mouillées pour éviter le dessèchement.
4. Retourner le flacon doseur et appuyer doucement pour déposer 1 goutte (environ 50µl) de Contrôle Négatif sur le puit n°1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif sur le puit n°2. Éviter de déborder des puits.
5. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Éviter de déborder des puits.
6. Replacer le couvercle sur la chambre et incubé les lames 30 minutes à température ambiante.
7. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette contenant environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un becher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
8. Retirer une (les) lame(s) du bac de coloration. Éliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. Déposer la lame dans la chambre d'incubation. Retourner les flacons doseurs de conjugué et déposer immédiatement 1 goutte (environ 50µl) dans chaque puit.
9. Répéter les étapes 7 à 8 avec chaque lame.
10. Replacer le couvercle sur la chambre d'incubation et incubé 30 minutes à température ambiante
11. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, plonger la lame dans un becher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration rempli de PBS pendant 10



minutes. Si un supplément de conjugué sans contre-coloration est utilisé (voir composé en option dans la Section Matériel Fourni), 2-3 gouttes de contre-coloration bleue d'Evans peuvent être ajoutée au lavage final. Répéter les opérations avec toutes les lames. REMARQUE: Un lavage incorrect peut augmenter le bruit de fond de fluorescence.

12. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. **Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est encore humide.**
13. Déposer doucement 3 **gouttes** de milieu de montage dans chaque puit et appliquer la lamelle couvre-lame. Ne pas appliquer de pression excessive et éviter les mouvements latéraux de la lamelle.
14. Répéter les étapes **12** et **13** avec chaque lame.
15. Observer la fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope au grossissement X200 ou plus.

Les lames peuvent être lues immédiatement. Cependant, grâce à la présence d'un agent anti-fading dans le milieu de montage, la lecture peut être retardée jusqu'à 48 heures sans perte significative de l'intensité de fluorescence. Dans ce cas les lames doivent être conservées à l'obscurité entre 2 et 8°C.

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les étapes 5 à 13 afin de définir son titre. Inclure dans chaque nouvelle série un contrôle positif et négatif. Les dilutions en série de 2 en 2 sont réalisées à partir du 1:10. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

Préparation des dilutions en série

Numéroter six tubes de 1 à 6. Ajouter 0.9 ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0.2 ml dans les tubes 2 à 6. Pipeter 0.1ml de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0.2 ml du tube 1 dans le tube suivant. Continuer à transférer 0.2 ml d'un tube à l'autre en mélangeant bien chaque tube pour arriver aux dilutions suivantes :

Éprouvettes	1	2	3	4	5	6
Sérum	0,1 ml					
	+					
Solution de dilution	0,9 ml	0,2 ml				
		↗	↗	↗	↗	↗
Transfer		0,2 ml				
Dilution finale	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

CONTROLE DE QUALITE

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne doit pas donner d'image fluorescente spécifique tandis que le contrôle positif doit donner une fluorescence de 2+ au moins.

Dans le cas où les contrôles ne donneraient pas les résultats attendus, il est recommandé de refaire le test. Si le problème persiste, cela peut être lié à:

- La turbidité. Eliminer le contrôle et en utiliser un nouveau.
- Au système optique du microscope. Par exemple: mauvais alignement, lampe ayant dépassé sa durée de vie, etc.
- A un assèchement des lames pendant la manipulation.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats des essais pour la recherche des anticorps AKA doivent être considérés négatifs (<10) ou bien positifs (plus grand ou égal à 320), ou encore positifs avec le titre

Lire la coloration de la couche de stratum corneum de l'épithélium pour les AKA, comme indiqué à la figure 1 à la fin de ce document.

**LIMITES D'UTILISATION**

Parfois un sérum AKA positif peut donner un résultat faiblement positif ou négatif à la dilution de dépistage (effet de zone). Dans ces cas douteux, les sérums devront être testés à des dilutions supérieures et, si le résultat est positif, déterminer le titre des anticorps.

Parfois la présence de deux ou plus anticorps différents dans le sérum ayant une réactivité vis-à-vis du même substrat peut créer des interférences pour la détection en immunofluorescence. Cela peut masquer la détection des AKA ou cacher le titre si l'anticorps qui interfère a un titre plus élevé que celui des AKA.

VALEURS PREVUES

Les AKA se retrouvent dans les sérums des patients en pre-RA et souffrant de RA. Ils sont rarement détectés chez des patients non atteints de RA.

Spécificité : 99%

Sensibilité : 44%

Valeur prédictive positive : 43%

La fréquence des AKA en relation avec la RA est indiquée dans le tableau 1 à la fin de ce document.



REFERENCES • BIBΛIOΓPAΦIA • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Young BJJ, Mallya RK, Leslie RDG, Clark CJM, Hamblin TJ. Antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. Br Med J; 1979, ii:97-99.
2. Aho K, von Essen R, Kurki P, Paluso T, Heliövaara M. Antikeratin antibody and antiperinuclear factor as markers for subclinical rheumatoid disease process. J Rheumatol; 1993, 20:1278-1281.
3. Kurki P, Aho K, Paluso T, Heliövaara M. Immunopathology of rheumatoid arthritis. Antikeratin antibodies precede the clinical disease. Arthr Rheum; 1992, 35:914-917.
4. Paimela L, Gripenberg M, Kurki P, Leirisalo-Repo M. Antikeratin antibodies: diagnostic and prognostic markers for early rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis; 1992, 51:743-746.
5. von Essen R, Kurki P, Isomäki H, Okubo S, Kautiainen H, Aho K. Prospect for an additional laboratory criterion for rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol; 1993, 22:267-272.
6. Vincent C, Serre G, Lapeyre F, Fournié B, Ayrolles C, Fournié A, Soleilhavoup J. High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called 'antikeratin antibodies'. Ann Rheum Diseases; 1989, 48:712-722.
7. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1993 [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395].

Figure 1: AKA Positive Reaction

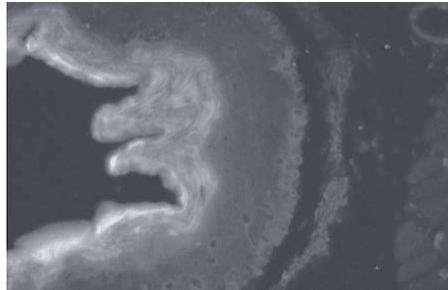


Table 1: AKA and RF in Patients With Peripheral Oligo/Polyarthritis in Relation to ARA* Criteria for RA

AKA	≥ 4 Criteria		3 Criteria		< 3 Criteria	
	RF+	RF -	RF+	RF-	RF+	RF -
Positive	27%	4%	18%	9%	4%	0%
Negative	44%	23%	18%	54%	12%	84%

Scand J Rheumatol; 1993, 22:267-272. *American Rheumatology Association



A. Menarini Diagnostics S.r.l.
via Sette Santi 3
50131 Firenze
Italia

UK

UNITED KINGDOM

Distributed by

A. Menarini Diagnostics Ltd
405 Wharfedale Road
Winnersh - Wokingham
Berkshire RG41 5RA

EL

Διανέμεται στην
ΕΛΛΑΔΑ από την

A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argypoulos
Attiki

ES

ESPAÑA

Distribuido por

A. Menarini Diagnostics
S.A.
Avenida del Maresme,120
08918 Badalona
Barcelona

DE

DEUTSCHLAND

Vertrieb durch

A. Menarini Diagnostics
Eine Division der Berlin-
Chemie AG
Glienicke Weg 125
12489 Berlin

AT

ÖSTERREICH

Vertrieb durch

A. Menarini Ges.m.b.H
Pottendorfer Straße, 25/27
A - 1120 Wien

FR

FRANCE

Distribué par

A. Menarini Diagnostics
France S.A.R.L.
3-5, Rue du Jura
BP 70511
94633 Rungis Cedex

BE

BELGIQUE

Distribué par

A. Menarini Diagnostics
Benelux S.A./N.V.
Belgicastraat, 4
1930 Zaventem

IT

ITALIA

Distribuito da

A. Menarini Diagnostics
Via lungo l'Enza, 7
50012 Bagno a Ripoli
Firenze

PT

PORTUGAL

Distribuido por

A. Menarini Diagnósticos, Lda
Quinta da Fonte
Edifício D.Manuel I, 2ºB
2770-203 Paço de Arcos

NL

NEDERLAND

Distributed by

A. Menarini Diagnostics
Benelux N.V.
De Haak, 8
5555 XK Valkenswaard

EN > Revision date: April 2008

EL > Ημερομηνία αναθεώρησης: Απρίλιος 2008

ES > Fecha de revisión: Abril de 2008

DE > Datum der Überarbeitung: April 2008

FR > Date de révision: Avril 2008

IT > Data di revisione: Aprile 2008

PT > Data de revisão: Abril de 2008

Document No. PI4122 CE M

