

## Méthode d'Immunofluorescence en Générale

### NOTICE POUR PRODUITS DE DIAGNOSTICS IN VITRO (IVD)

#### USAGE PREVU

Les composants indiqués ci-dessous peuvent être utilisés pour la détection des anticorps dans le sérum humain par immunofluorescence indirecte.

#### RESUME ET EXPLICATION

Ces instructions d'utilisation fournissent un protocole général d'utilisation des lames de substrats et des conjugués appropriés pour les études en immunofluorescence indirecte. Les auto-anticorps peuvent être visualisés sur divers substrats, coupes de tissus ou cultures cellulaires, en utilisant un conjugué FITC. Le principe de la procédure est décrit dans la section suivante. Les laboratoires individuels peuvent utiliser cette notice de produit comme guide mais doivent effectuer une validation des protocoles internes en utilisant ces matériels.

#### PRINCIPES DE LA METHODE

Les composants cités ci-dessous peuvent être utilisés dans les protocoles d'immunofluorescence indirecte. Dans ce type de protocole, les sérums de patient sont incubés sur une lame de substrat, ce qui permet la fixation des anticorps. Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Les anticorps liés à des classes IgA, IgG et/ou IgM, selon le conjugué utilisé, sont détectés par incubation du substrat avec un conjugué anti-Immunoglobuline marqué à la fluorescéine (anti-Ig – FITC). Les réactions Ag-Ac sont observées sous un microscope à fluorescence équipé de filtres appropriés. Une fluorescence vert pomme des structures histologiques spécifiques du substrat indique la présence d'anticorps. Le titre est alors déterminé par dilutions successives de l'échantillon. La plus grande dilution montrant encore un résultat positif est le titre.<sup>1</sup>

#### INFORMATION PRODUIT

##### Conservation et préparation

Conserver tous les réactifs entre 2<sup>e</sup>t 8°C. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi après avoir atteint la température ambiante du laboratoire.

##### Matériels fournis

Ces instructions sont fournies pour l'utilisation de chacun des composants, aux codes de produit indiqués ci-dessous. Les lames de substrats sont indiquées à côté du conjugué approprié pour la détection des auto-anticorps sur un substrat particulier.

Lame substrat		Conjugué		Pos Con		Dilution Echantillon	Temps Incubation Echantillon*
[REF]	Description	[REF]	Description	[REF]	Description		
39499	Lame Glande Surrénale Singe, 4 puits	38013	Conjugué FITC de chèvre anti-IgG humaines avec la contre-coloration Bleu d'Evans, 5ml	38029	Contrôle Positif Anticorps Surrénale	1:4	30 minutes
39500	Lame Oesophage Singe, 4 puits	38013	Conjugué FITC de chèvre anti-IgG humaines avec la contre-coloration Bleu d'Evans, 5ml	38048 et/ou 38042	Contrôle Positif InterCellulaire (IC) et/ou Contrôle Positif Anticorps BMZ	1:10	30 minutes
39501	Lame Thyroïde Singe, 4 puits	38013	Conjugué FITC de chèvre anti-IgG humaines avec la contre-	38038	Contrôle Positif Anticorps Thyroïde/ Microsomal	1:10	30 minutes

			coloration Bleu d'Evans, 5ml				
39502	Lame Nerf Sciatique Singe, 6 puits	39729	Conjugué FITC chèvre anti- IgM humaines avec contre-coloration Bleu d'Evans, 5ml	39727	Contrôle Positif Anti-MAG	1:10	30 minutes
39503	Lame Cervelet Singe, 6 puits	38013	Conjugué FITC de chèvre anti-IgG humaines avec la contre-coloration Bleu d'Evans, 5ml	39726	Contrôle Positif Anticorps anti-Hu	1:10	30 minutes
39504	Lame Ovaire Singe, 4 puits	38013	Conjugué FITC de chèvre anti-IgG humaines avec la contre-coloration Bleu d'Evans, 5ml	38051	Contrôle Positif Anticorps Cellule Stéroïde	1:10	3 heures
39505	Lame Muscle Cardiaque Singe, 6 puits	38013	Conjugué FITC de chèvre anti-IgG humaines avec la contre-coloration Bleu d'Evans, 5ml	38040	Contrôle Positif Anticorps Muscle Cardiaque / Squelettique	1:10	30 minutes
39514	Lame Estomac Singe, 6 puits	38013	Conjugué FITC de chèvre anti-IgG humaines avec la contre-coloration Bleu d'Evans, 5ml	38047	Contrôle Positif ASMA	1:10	30 minutes
39515	Lame Muscle Squelettique Singe, 6 puits	38013	Conjugué FITC de chèvre anti-IgG humaines avec la contre-coloration Bleu d'Evans, 5ml	38040	Contrôle Positif Anticorps Muscle Cardiaque / Squelettique	1:10	30 minutes
39516	Lame Glande Salivaire Singe, 6 puits	38013	Conjugué FITC de chèvre anti-IgG humaines avec la contre-coloration Bleu d'Evans, 5ml	38057	Contrôle Homogène ANA	1:10	30 minutes
39517	Lame Testicule Singe, 4 puits	38013	Conjugué FITC de chèvre anti-IgG humaines avec la contre-coloration Bleu d'Evans, 5ml	38051	Contrôle Positif Anticorps Cellule Stéroïde	1:10	3 heures

\* La deuxième incubation (incubation conjugué) est dans tous les cas de 30 minutes.

#### Composants en option

[REF]	Description	Cond.
38013	FITC Chèvre anti IgG humaines avec Bleu d'Evans	5ml
39614	FITC Chèvre anti IgG humaines avec Bleu d'Evans	15ml
38012	FITC Chèvre anti IgA humaines avec Bleu d'Evans	5ml
39612	FITC Chèvre anti IgA humaines avec Bleu d'Evans	15ml
39729	FITC Chèvre anti IgM humaines avec Bleu d'Evans	5ml
38011	FITC Chèvre polyvalent anti (IgG/IgA) humaines avec Bleu d'Evans	5ml
39610	FITC Chèvre polyvalent anti (IgG/IgA) humaines avec Bleu d'Evans	15ml
39608	FITC Chèvre polyvalent anti (IgG/IgA/IgM) humaines avec Bleu d'Evans	5ml
39606	FITC Chèvre polyvalent anti (IgG/IgA/IgM) humaines avec Bleu d'Evans	15ml
38009	FITC Chèvre anti IgG humaines sans Bleu d'Evans	5ml

39613	FITC Chèvre anti IgG humaines sans Bleu d'Evans	15ml
38008	FITC Chèvre anti IgA humaines sans Bleu d'Evans	5ml
39611	FITC Chèvre anti IgA humaines sans Bleu d'Evans	15ml
39728	FITC Chèvre anti IgM humaines sans Bleu d'Evans	5ml
38006	FITC Chèvre polyvalent anti (IgG/IgA) humaines sans Bleu d'Evans	5ml
39609	FITC Chèvre polyvalent anti (IgG/IgA) humaines sans Bleu d'Evans	15ml
39607	FITC Chèvre polyvalent anti (IgG/IgA/IgM) humaines sans Bleu d'Evans	5ml
39605	FITC Chèvre polyvalent anti (IgG/IgA/IgM) humaines sans Bleu d'Evans	15ml
38005	Contrôle Négatif IFA	0,5ml
38048	Contrôle Positif anti-IC	0,5ml
38045	Contrôle Positif anti-IC ( <i>pemphigus vulgaris</i> )	0,5ml
38043	Contrôle Positif anti-IC ( <i>pemphigus foliaceus</i> )	0,5ml
38042	Contrôle Positif anti-BMZ ( <i>pemphigus</i> )	0,5ml
38040	Contrôle Positif anti- Muscle Cardiaque/Squelettique	0,5ml
38038	Contrôle Positif anti-Thyroïde/Microsomal	0,5ml
38029	Contrôle Positif anti-Surrénale	0,5ml
38051	Contrôle Positif anti-Cellule Stéroïdale	0,5ml
38057	Contrôle Positif ANA Homogène	0,5ml
38047	Contrôle Positif ASMA	0,5ml
39727	Contrôle Positif anti-MAG	0,5ml
39726	Contrôle Positif anti-Hu	0,5ml
38024	Contrôle IC Titre Bas	0,5ml
38019	PBS	pour 1 litre
38018	Diluant Echantillon	60ml
38016	Lamelles couvre-objet (24x60mm)	boîte de 12
38015	Flacon Milieu de Montage	5ml
38014	Contre-coloration Bleu d'Evans	1.0ml

### Symboles utilisés sur les étiquettes:

[LOT]	Numéro de lot
[REF]	Numéro de catalogue
e	A utiliser avant
t	Température de conservation
!	Lire les instructions d'utilisation
[IVD]	Utilisation diagnostic In vitro
	Fabricant
s	Nombre de Tests

### Matériel nécessaire mais non fourni

Microscope à fluorescence  
 Micropipette ou pipette Pasteur  
 Pipettes sérologiques  
 Bac à coloration (bac Coplin)  
 Petits tubes (ex : 13 X 75 mm) et porte-tubes  
 Eau distillée ou déionisée  
 Epruvette graduée 1l  
 Flacon pour solution de lavage  
 Papier absorbant  
 Chambre humide 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 négatif aux Ags HBs, HCV et aux VIH1, VIH2 et HTLV-I. Du fait qu'aucun test connu 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'usage<sup>2</sup>.

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azides métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azides 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.

## 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 -80°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

## PROCEDURE

### MODE OPERATOIRE

#### A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient à l'aide du diluant échantillon fourni selon les dilutions recommandées dans la section Matériels fournis, 1:4 (0,1 ml sérum + 0.3 ml diluant) ou 1:10 (10 µl sérum + 90 µl 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 atteindre 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 d'incubation 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. Eviter 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. Eviter de déborder des puits.
6. Replacer le couvercle sur la chambre et incuber les lames 30 minutes à température ambiante selon les durées d'incubation recommandées dans la section Matériels fournis.
7. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant au 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 de lavage de lames et laisser tremper 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
8. Retirer la (les) lame(s) du bac de lavage. Eliminer 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 et 8 avec chaque lame.
10. Replacer le couvercle sur la chambre d'incubation et incuber 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 une contre coloration est souhaitée (voir composants en option dans la section Matériels fournis), ajouter 2-3 gouttes de Bleu d'Evans dans le dernier bain de lavage. 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 suivante pendant que la lame est encore humide.
13. Déposer doucement 3 gouttes de milieu de montage dans chaque puit et appliquer la lamelle couvre-objet. 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. Réaliser deux dilutions en démarrant à la dilution initiale du dépistage. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive. Des tableaux pour les dilutions standard de dépistage sont repris ci-dessous :

#### Préparation des dilutions en série commençant à 1:4

Numéroter six tubes de 1 à 6. Ajouter 0.3 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 2 et agiter soigneusement. Continuer à transférer 0.2 ml d'un tube à l'autre en mélangeant bien chaque tube pour arriver aux dilutions reprises dans le tableau suivant :

Tubes	1	2	3	4	5	6
Sérum	0.1 ml					
	+					
Diluant Echantillon	0.3 ml	0.2 ml				
		↗	↗	↗	↗	↗
Transfert		0.2 ml				
Dilution Finale	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128 etc.

#### Préparation des dilutions en série commençant à 1:10

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 2 et agiter soigneusement. Continuer à transférer 0.2 ml d'un tube à l'autre en mélangeant bien chaque tube pour arriver aux dilutions reprises dans le tableau suivant :

Tubes	1	2	3	4	5	6
Sérum	0.1 ml					
	+					
Diluant Echantillon	0.9 ml	0.2 ml				
		↗	↗	↗	↗	↗
Transfert		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. Le laboratoire doit déterminer ses propres caractéristiques de performance du Contrôle Positif utilisé.

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 dessèchement des lames pendant la manipulation.

## **INTERPRETATION DES RESULTATS**

Les résultats des test par immunofluorescence sont généralement considérés négatifs avec un titre inférieur à la dilution de dépistage, positifs avec un titre plus élevé ou égal à la dilution de dépistage ou, mieux encore, positif avec un titre spécifique à l'extinction du signal. Les laboratoires doivent valider les protocoles pour l'utilisation de ces matériels et former des techniciens pour lire les aspects de fluorescence spécifiques du matériel utilisé et du test effectué.

## **LIMITATION DE LA PROCEDURE**

Lors du diagnostique, il faut tenir compte également des résultats des autres tests de laboratoire et des conditions cliniques du patient en plus des résultats des tests par immunofluorescence indirecte.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 3-40, 1987.
2. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1993 [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395].