



**A.MENARINI**  
diagnostics

## Test anticorps anti-ADN natif (ADNn)

Substrat *Crithidia luciliae*

IVD

### ENCART DU PRODUIT

**REF** 37811 nDNA Kit 48 Tests

**REF** 37791 Lamelle Anti-nDNA *Crithidia luciliae* 6 Puits

### USAGE PRÉVU

Test d'immunofluorescence indirecte pour la recherche et la quantification d'anticorps de l'acide désoxyribonucléique natif (double brin) (ADNn) dans le sérum humain.

### RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les anticorps anti-ADNn sont spécifiques du lupus systémique érythémateux (SLE) et se manifestent rarement chez les malades atteints de polyarthrite rhumatoïde, de sclérodémie ou d'autres affections auto-immunes. La fréquence et le titre de ces anticorps fluctuent avec l'activité de la maladie et ont tendance à disparaître sous un traitement immunosuppresseur et pendant la période de rémission. Il existe une bonne corrélation entre l'activité de la maladie et le niveaux des anticorps anti-ADNn<sup>2-7</sup>.

Les deux méthodes les plus communément employées pour détecter les anticorps anti-ADNn sont le dosage radioimmunologique et l'immunofluorescence. La spécificité et la sensibilité de la méthode immunofluorescente *Crithidia luciliae* sont comparables ou même meilleures que le dosage radioimmunologique<sup>8-14</sup>. Le test d'immunofluorescence indirecte en utilisant *Crithidia luciliae* en tant que substrat antigénique représente une méthode simple et spécifique de détection des anticorps anti-ADNn. La *Crithidia luciliae* contient un kinétoplaste, une organelle qui est formé d'un ADN circulaire compact qui devient de couleur vert pomme brillant quand l'échantillon de test est positif.

### PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Dans la méthode par immunofluorescence indirecte utilisée dans cet équipement, le sérum du patient est incubé sur des taches de *Crithidia luciliae* pour permettre la liaison des anticorps avec le substrat. Tous les anticorps non liés sont éliminés par un rinçage. Les anticorps liés de la classe IgG sont détectés par incubation du substrat avec un conjugué d'anticorps à marquage fluorescéine pour l'IgG humain. Quand elles sont observées sous un microscope à fluorescence équipé avec les filtres appropriés, les réactions positives apparaissent comme une fluorescence vert pomme du kinétoplaste avec ou sans coloration nucléaire<sup>15,16</sup>. Le titre, qui est la réciproque du nombre représentant la plus forte dilution pour laquelle une réaction positive est observée, est déterminé en testant des dilutions en série<sup>17</sup>.

### INFORMATION SUR LE PRODUIT

#### Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8°C. Les réactifs sont prêts à l'usage après un équilibrage à température ambiante.

#### Matériel fourni

Menarini™ nDNA Kit **REF** 37811

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 48 tests chacun

8x

**SORB** **SLD** **6**

6 lames de substrat en puits, *Crithidia luciliae*

1 x 0,5 ml

**CONTROL** **+** **nDNA** \*

Régulateur positif ADNn Contient du sérum humain.

1 x 0,5 ml

**CONTROL** **-** \*

Régulateur négatif. Contient du sérum humain.


 1 x 5 ml IgG-CONJ FITC EB \*

Conjugué d'anticorps FITC pour l'IgG humain contenant du Bleu Evans.  
 Conserver à l'abri de la lumière.

 1 x 60 ml BUF \*

Solution de dilution

 2 fioles BUF WASH

Solution saline phosphate (PBS). Dissoudre chaque fiole dans un litre.

 1 x 5,0 ml MOUNTING MEDIUM \*

Milieu de montage Ne pas congeler.

 1 x 12 COVER SLD

Lamelles de protection

### 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% NaN<sub>3</sub>

### 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
- Boîte de coloration (p. ex. Tube de Coplin)
- Petites éprouvettes (par exemple 13 x 75 mm) et râtelier à éprouvettes eau distillée ou désionisée
- Récipient de 1 litre
- Flacon-laveur
- Serviettes de papier absorbant
- Chambre d'incubation



## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Destiné à un usage diagnostique in vitro Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Tous les échantillons de sérum humain et les substances dérivées de l'être humain devraient être traités comme étant potentiellement dangereux, sans égard pour leur origine. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux<sup>22</sup>.

**AVERTISSEMENT** – L'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue de Menarini™. Ne pas utiliser après l'expiration de la date de péremption.

## RÉCOLTE DES ÉCHANTILLONS ET MANIPULATION

Seuls des échantillons de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des échantillons grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les échantillons à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

## PROCÉDURE MÉTHODE DE TEST

### A. Dépistage

1. Diluez chaque échantillon patient 1:10 avec la solution de dilution fournie (10 µl sérum + 90 µl diluant). Ne pas diluer les régulateurs positif ou négatif. Conserver du sérum non dilué pour déterminer des titres d'anticorps si les tests de dépistage apparaissent être positifs.
2. Laisser les sachets qui contiennent les lames de substrat atteindre la température ambiante pendant 10-15 minutes. Retirer avec soin les lames sans toucher le substrat.
3. Étiqueter les lames et les placer dans une chambre d'incubation entourée de serviettes en papier humidifiées avec de l'eau pour empêcher le séchage.
4. Renverser la fiole compte-gouttes et appuyer doucement pour appliquer 1 goutte (approximativement 50 µl) de régulateur négatif au puits #1. De la même façon, appliquer 1 goutte de régulateur positif au puits #2. Éviter de faire déborder les puits.
5. En utilisant une micropipette ou une pipette Pasteur, appliquer 1 goutte de sérum de patient dilué (approximativement 50 µl) aux autres puits. Éviter de faire déborder les puits.
6. Placer le couvercle sur la chambre d'incubation et incuber les lames pendant 30 minutes à température ambiante.
7. Retirer une lame de la chambre d'incubation. Tenir l'extrémité et rincer doucement avec approximativement 10 ml PBS en utilisant une pipette, ou rincer la lamelle dans un bécher rempli de PBS. Ne pas utiliser de flacon-laveur. Transférer immédiatement la lame dans le tube de Coplin et laver pendant 10 minutes. Refaire le même processus avec toutes les lames restantes.
8. Enlever les lames du tube de Coplin. Sécher le bord de la lame sur une serviette en papier pour enlever le PBS en excédent. Placer la lame dans la chambre d'incubation. Renverser immédiatement la fiole compte-gouttes de conjugué et appuyer doucement pour appliquer 1 goutte (approximativement 50 µl) à chaque puits.
9. Recommencer les étapes **7 et 8** pour chaque diapositive.



10. Remettre le couvercle sur la chambre d'incubation. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
11. Retirer une lame de l'incubateur. Tenir la lame par une extrémité et tremper la lame dans un vase à bec contenant du PBS pour éliminer le conjugué en excédent. Placer les lames dans une boîte de coloration remplie de PBS pendant 10 minutes. Si on veut, 2-3 gouttes de coloration de contraste bleu Evans peuvent être ajoutées au rinçage final. Recommencer l'opération pour les lames restantes. NOTE : Un lavage inadéquat peut mener à une augmentation de la fluorescence de fond.
12. Retirer une lame de la boîte de coloration. Sécher le bord de la lame sur une serviette en papier pour enlever le PBS en excédent **Pour empêcher le séchage de la lame, poursuivre immédiatement en réalisant l'étape suivante pendant que la lame est encore mouillée.**
13. Monter la lamelle de protection en y appliquant 3 gouttes de milieu de montage et placer la sur la lame. Éviter d'exercer une pression trop forte et éviter tout mouvement latéral de la lamelle de protection.
14. Recommencer les étapes 12 et 13 pour chaque lame.
15. Utiliser un microscope à fluorescence avec un grossissement de 200x ou supérieur pour la visualisation des résultats.

Les lames peuvent être lues dès qu'elles sont préparées. Cependant, en raison de la présence d'un agent évitant la diminution de l'intensité du signal lumineux dans le milieu de montage, aucune perte significative de l'intensité de la coloration ne se produit si la lecture est effectuée après plus de 48 heures. Les lames doivent être stockées dans l'obscurité à 2-8°C.

## B. Détermination du critère d'évaluation (titrage)

Un sérum positif dans le test de dépistage peut être testé davantage en suivant les étapes 5 à 13 pour déterminer le titre. Chaque passage du test doit inclure les régulateurs positifs et négatifs. Faire des dilutions en double en double qui commencent à 1:10. La plus forte dilution produisant une réaction positive correspond au titre.

### Préparation des dilutions en série

Numéroter six éprouvettes de 1 à 6. Ajouter 0,9 ml de diluant d'échantillon à l'éprouvette 1 et 0,2 ml aux éprouvettes de 2 à 6. Pipeter 0,1 ml de sérum non-dilué dans l'éprouvette 1 et mélanger soigneusement. Transférer 0,2 ml du tube 1 au tube 2 et mélanger soigneusement. Continuer à transférer 0,2 ml d'une éprouvette à l'autre après avoir mélangé pour produire les dilutions figurant dans le tableau suivant :

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

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un régulateur positif et un régulateur négatif doivent être inclus à chaque étape du test. Le régulateur négatif ne doit pas présenter de fluorescence spécifique du kinétoplaste, alors que le régulateur positif doit présenter une intensité de coloration 2+ ou supérieure pour cette structures.

Si les résultats attendus ne sont pas obtenus, l'opération doit être recommencée. Si des résultats inadéquats continuent à se manifester avec les régulateurs, cela peut être dû à :

- Turbidité. Jeter et utiliser un autre contrôle
- Problèmes avec le système optique du microscope à fluorescence. Ceux-ci peuvent comprendre : alignement incorrect, ampoule au-delà de sa durée de vie prévue, etc.,
- Permettre à la lame de sécher pendant la procédure.



## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des tests pour les anticorps anti-ADNn doivent être rapportés comme étant négatifs (< 10), positifs (supérieur ou égal à 320) ou alternativement positifs avec titre.

Ne lire que les champs qui contiennent le *C. luciliae* bien séparé. Observer la coloration spécifique du kinétoplaste (consulter la figure 1 à la fin du présent document). La coloration du noyau ou du corps polaire ne devrait pas être interprété comme un test anticorps ADN positif. L'absence de coloration spécifique du kinétoplaste est considérée comme étant négative pour les anticorps anti-ADNn.

## LIMITES DE LA PROCÉDURE

Dans certains cas, le sérum positif pour la coloration du kinétoplaste peut se révéler très faible ou négatif pour la dilution de dépistage du phénomène de prozone. Dans de tels cas douteux, le sérum doit être testé à des dilutions plus élevées et, s'il est positif, les titres de l'anticorps doivent être déterminés.

Dans de rares cas, de fausses réactions positives peuvent être observées. Ceci peut être dû à la présence de hauts niveaux de lipoprotéines ou d'autres protéines qui se lient à l'ADN<sup>19,20</sup>.

Le conjugué d'anticorps pour l'IgG humain FITC fourni dans cet équipement est essentiellement spécifique des chaînes lourdes mais présente également quelque activité relatives aux chaînes légères. Il réagit essentiellement avec les anticorps de la classe IgG, mais peut, à un degré moindre, réagir avec les chaînes légères d'autres classes telles qu'IgM.

Le clinicien devrait tenir compte des résultats de tous les tests par immunofluorescence indirecte positifs sur la base des résultats d'autres essais de laboratoire et de la condition clinique du malade quand il pose un diagnostic.

## VALEURS ATTENDUES

Comme le montre le tableau 1 à la fin de ce document, les anticorps anti-ADNn ne sont pas détectés (titre < 10) dans le sérum de sujets normaux ou de malades présentant une sclérodermie ou une polyarthrite rhumatoïde. Les anticorps anti-ADNn (titre >10) se manifestent chez la moitié des patients présentant un lupus érythémateux systémique.

## DONNÉES DE RENDEMENT

Le test anticorps anti ADNn Menarini™ a été comparé avec un autre test par anticorps fluorescent disponible dans le commerce qui utilise la *C. luciliae* comme substrat. La comparaison inclut 106 échantillons de sérum provenant de sujets normaux de même que de patients présentant un diagnostic de lupus érythémateux systémique ou de polyarthrite rhumatoïde. Les sérums ont été testés conformément à la procédure et à la dilution de dépistage recommandée par le fabricant. Ceux-ci ont donné des résultats comparables comme cela figure dans le tableau 2.



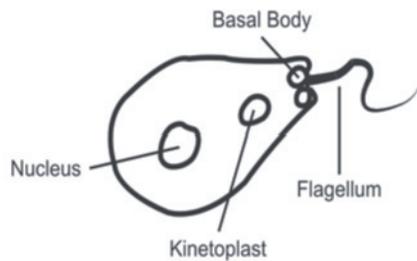
**REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA**

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33: 167-240, 1982.
2. Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity of the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1, Cruse JM and Lewis RE Jr, Eds, Karger, Basel, 318-353, 1985.
3. Reimer G, Cornell RC and Tan EM. The biochemical nature of nuclear antigens reactive with antinuclear antibodies. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 519-531, 1987.
4. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Standardization of antinuclear antibody and other immunofluorescent tests used in immunopathologic studies of the skin. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 41-64, 1987.
5. Tan EM, Chan EKL, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 47: 121-141, 1988.
6. Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A and Meyer zum Büschenfelde KH. Significant autoimmune markers of autoimmune liver disorders: Current status. *J Clin Lab Anal* 1: 362-370, 1987.
7. Mackay IR. Autoimmunity and the liver. *Clin Aspects Immunity* 2: 8- 17, 1988.
8. McMillan SA, Alderdice JM, McKee CM et al. Diversity of autoantibodies in patients with anti-mitochondrial antibody and their diagnostic value. *J Clin Path* 4: 232-236, 1987.
9. Gershwin ME, Coppel RL and Mackay IR. Primary biliary cirrhosis and mitochondrial autoantigens - insights from molecular biology. *Hepatology* 8: 147-151, 1988.
10. Berg PA and Klein R. Mitochondrial antigens and autoantibodies from anti-M1 to anti-M9. *Klin Wochenschr* 64: 897-909, 1986.
11. Popper H and Paronetto F. Clinical, histologic and immunopathologic features of primary biliary cirrhosis. *Springer Semin Immunopathol* 3: 339-354, 1980.
12. Berg PA and Bacon H. Serology of primary biliary cirrhosis. *Springer Semin Immunopathol* 3: 355-373, 1980.
13. Anderson P, Small JV and Sobieszek A. Studies on the specificity of smooth muscle antibodies. *Clin Exp Immunol* 22: 22-29, 1975.
14. Kurki P, Miettinen A, Linder E, Pikkarainen P, Vuaristo M and Salaspuro MP. Different types of smooth muscle antibodies in chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis: Their diagnostic and prognostic significance. *Gut* 21: 878-884, 1980.
15. Fisher JB and Taylor KB. The significance of gastric antibodies. *Brit J Haematol* 20: 1-7, 1971.
16. Chisholm M. Immunology of gastritis. *Clin Gastroenterol* 5: 419-428, 1976.
17. Bigazzi PE, Burek CL and Rose NR. Antibodies to tissue-specific endocrine, gastrointestinal and neurological antigens. In "Manual of Clinical Laboratory Immunology". Rose NR, Friedman H and Fahey JL, Eds, American Society for Microbiology, Washington DC, 762-770, 1986.
18. 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.
19. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1993 [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395].
20. Nisengard RJ. Antinuclear antibodies: Significance of titers. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Bean S, Eds, John Wiley and Sons, New York, 2nd Ed, 387-398, 1979.



21. Meyer zum Büschenfelde KH, Manns M and Trautman F. Autoimmunity in chronic liver diseases - relationship to SLE? In "Recent Advances in Systemic Lupus Erythematosus". Lambert PH, Perrin L, and Izui S, Academic Press, New York, 259-269, 1984.
22. Walker JG, Doniach D, Roitt IM and Sherlock S. Serologic tests in the diagnosis of primary biliary cirrhosis. Lancet 1: 827, 1965.
23. Paronetto F and Popper H. Hetero-iso- and autoimmune phenomena in the liver. In "Textbook of Immunopathology", Miescher PA and Müller-Eberhard HJ, Eds, Grune and Stratton, New York, 2nd Ed, 789-817, 1976.

**Figure 1. C. luciliae**



**Table 1. Incidence of Antibodies to *n*DNA in Collagen-Vascular Disorders as detected by Indirect Immunofluorescence on *C. luciliae***

Clinical Condition	No. Tested	No. Positive	% Positive
SLE	28	19	68
Scleroderma	23	0	0
Rheumatoid Arthritis	8	0	0
Normal Controls	106	0	0

**Table 2. Comparison of Kits using *C. luciliae* Substrate for the Detection of Antibodies to *n*DNA**

Clinical Condition	n	Menarini™		Other	
		Positive	% Positive	Positive	% Positive
SLE	28	19	68	13	46
Scleroderma	23	0	0	0	0
Rheumatoid Arthritis	8	0	0	0	0
Normal Controls	106	0	0	0	0



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

**EL**

Διανέμεται στην  
**ΕΛΛΑΔΑ** από την  
A. Menarini Diagnostics S.A.  
575, Vouliagmenis Ave.  
16451 Argypopolis  
Attiki

**AT**

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

**BE**

**BELGIQUE**  
Distribué par  
A. Menarini Diagnostics  
Benelux S.A./N.V.  
Belgicastraat, 4  
1930 Zaventem

**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

Date of issue: March 2007  
Data de publicação: Março de 2007  
Ausgabedatum: März 2007  
Date d'émission : Mars 2007  
Ημερομηνία έκδοσης: Μάρτιος 2007

Document No. PI4101 M

