



Anticorps anti-ADN double brin ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 37793 Anticorps dsDNA ELISA 96 Tests

USAGE PREVU

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA pour la détection et la quantification des anticorps IgG de l'ADN double brin (dsDNA) dans le sérum humain.

RESUME ET EXPLICATION

Les anticorps antinucléaires (ANA) se retrouvent dans plusieurs maladies auto-immunes. Les anticorps antinucléaires (ANA) comprennent des anticorps des antigènes du noyau tel que l'ADN, l'histone et plusieurs antigènes nucléaires extractibles tels que RNP, Sm, SS UN et SS-B. Il existe trois spécificités d'anticorps anti-ADN:

1. des anticorps anti-ADN double brin qui réagissent seulement avec l'ADN double brin
2. des anticorps anti-ADN double brin qui réagissent seulement avec l'ADN simple brin
3. des anticorps anti-ADN double brin/simple brin qui réagissent aussi bien avec l'ADN double brin qu'avec l'ADN simple brin

De ces trois types, les anticorps anti-ADN double brin sont caractéristiques du lupus systémique érythémateux (SLE). Ils se manifestent rarement dans d'autres maladies auto-immunes¹⁻⁶. La fréquence et les niveaux de ces anticorps fluctuent avec l'activité de la maladie, on les retrouve en général dans approximativement 50-55% des cas de SLE et chez approximativement 89% des malades SLE présentant une maladie rénale active³⁻⁷. Les anticorps de l'ADN double brin disparaissent à l'occasion d'un traitement immunosuppresseur et durant la rémission. Il existe une bonne corrélation entre l'activité de la maladie et les niveaux d'anticorps anti-ADN double brin⁸. Le dosage ELISA des anticorps anti-ADN double brin Menarini™ détecte et quantifie les anticorps ADN double brin de la classe IgG. Des anticorps anti-ADN d'isotypes IgM et IgA se manifestent aussi, mais les anticorps de la classe IgG se sont montrés significatifs du point de vue clinique³. Les résultats sont fournis en Unités Internationales (IU)/ml. Aussi bien le étalon que la régulation positive ont été étalonnés par rapport au réactif de référence WO/80 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test est exécuté sous la forme d'une méthode immuno-enzymatique (*solid phase enzyme labeled immunosorbent assay - ELISA*). Des microplaques à puits sont enduites avec un antigène de l'ADN double brin et les sites inaltérés sont bloqués pour réduire l'agglutination non-spécifique. Les régulateurs, les étalons et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits enduits d'antigène qui permettent aux anticorps spécifiques anti-ADN double brin qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques. Les anticorps agglutinés sont détectés en ajoutant aux puits un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage. La phosphatase alcaline et son substrat (pNPP) sont ensuite ajoutés aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion du substrat de pNPP en un produit de réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en Unités Internationales par millilitre (IU/ml).

REACTIFS

Stockage et Préparation

Entreposer tous les réactifs entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.**



Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant l'usage.

Quand il est entreposé entre 2 et 8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration de l'équipement. Reconstituer la solution de lavage en 1 litre, avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée.

Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

Précautions

Pour 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. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ce matériel.

AVERTISSEMENT – L'azide de sodium (NaN₃) 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 responsable 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 d'A. Menarini Diagnostics S.r.l.. Il faut respecter de bonnes pratiques de laboratoire pour limiter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs au moment de la manipulation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Matériel fourni

Menarini™ anticorps dsDNA ELISA **REF** 37793

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.

12 x 8	MICROPLATE dsDNA	Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène dsDNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A dsDNA *	Etalon A (couverture verte) , prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-ds-DNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B dsDNA *	Etalon B (couverture violette) , prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ds-DNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C dsDNA *	Etalon C (couverture bleue) , prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ds-DNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D dsDNA *	Etalon D (couverture jaune) , prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ds-DNA.
1 x 1,5 ml	CONTROL + dsDNA *	Régulation positive (couverture rouge) , prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ds-DNA.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Régulation négative (couverture blanc) , prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines. Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL *	Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.


 1 x 12 ml **SUBSTRATE** *

 1 x 12 ml **STOP**

 2 x **BUF WASH**

Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. **Protéger de la lumière.**

Solution d'arrêt prête à l'emploi.

Tampon de lavage en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

* 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



Pour usage diagnostique In vitro



Fabricant



Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée
- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.
- Nettoyeur automatique de microplaque en mesure de dispenser 200 µl

RECOLTE DES SPECIMENS ET MANIPULATION

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

PROCEDURE

Notes de procédure

- Avant de commencer le test, lire avec soin la brochure accompagnant le produit.
- Conserver les spécimens de sérum et les réactifs de test à température ambiante avant d'entreprendre la

procédure de test. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.

- Toutes les dilutions des échantillons des patients doivent être préparées avant de commencer l'essai.
- Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. Si le lavage est réalisé manuellement, il est fait de manière adéquate en dirigeant un flux puissant de solution de lavage avec un flacon-laveur à pointe large à travers toute la microplaque. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs devrait avoir lieu au même taux et selon la même séquence.
- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.

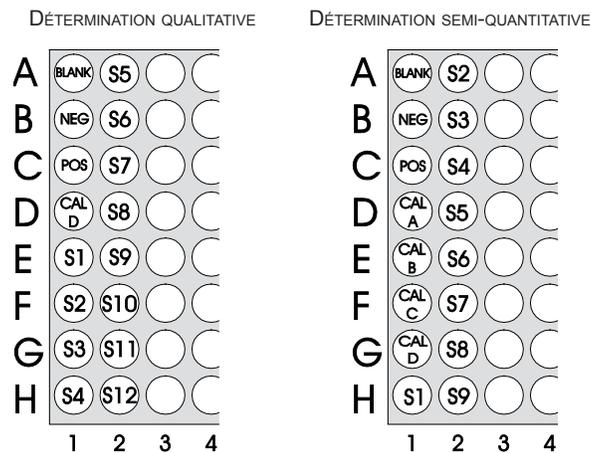
Méthode de test

Etape 1 Laisser tous les réactifs et les spécimens atteindre la température ambiante.

Etape 2 Étiqueter les feuillets de protocole pour indiquer le placement de l'échantillon dans les puits. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.

Etape 3 Pour une **détermination qualitative**, utiliser seulement l'Étalon Bas D prêt à l'emploi (*flacon avec couvercle jaune*).

ou Pour un **dosage semi-quantitatif**, utiliser les Étalons A à D prêts à l'emploi comme montré dans le schéma d'échantillon figurant ci-dessous.



Etape 4 Préparer une dilution 1:101 des échantillons patients en mélangeant 5 µl du sérum patient avec 0.5 ml de diluant de sérum.

Etape 5 Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer solidement les microplaques à puits dans le support fourni comme accessoire.

Etape 6 Pipeter **100 µl** des étalons prêts à l'emploi, des régulateurs positifs et négatifs et des échantillons patients dilués dans les puits appropriés, conformément au feuillet de protocole.

Note : Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif blanco. Mettre le lecteur ELISA à zéro sur le réactif blanco.



- Etape 7** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 8** Laver **4x** avec la solution de lavage. En cas de lavage manuel, remplir chaque puits avec de la solution de lavage reconstituée. Eliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque puits ou en aspirant le liquide de chaque puits. Pour absorber à la fin du dernier lavage, renverser les bandes et tapoter vigoureusement les puits sur les serviettes de papier absorbant. Dans le cas de dispositifs de lavage automatiques, programmer le dispositif de lavage en suivant les instructions du fabricant.
- Etape 9** Pipeter **100 μ l** de conjugué dans les microplaques à puits.
- Etape 10** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 11** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 8.
- Etape 12** Pipeter **100 μ l** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrer comme pour le conjugué.
- Etape 13** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 14** Pipeter **100 μ l** de solution d'arrêt dans chaque puits en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de 1 heure après l'addition de la solution d'arrêt.
- Etape 15** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif blanco programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

Les étalons, répondant au standard du réactif de référence WO/80 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les régulateurs positif et négatif et un réactif blanco doivent être utilisés lors de chaque test pour vérifier la conformité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif blanco devrait être < 0.3 .

Dosage qualitatif

- Le régulateur positif doit être supérieur à la valeur [IU/ml] de l'Etalon D.
- La densité optique de l'Etalon D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif.

Dosage semi-quantitatif

- L'étalon A doit présenter une lecture d'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé.
- Le régulateur négatif doit être inférieur à 60 IU/ml
- Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer IU/ml
- Le régulateur positif doit fournir des valeurs dans la plage figurant sur le flacon.

RESULTATS

Calculs

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

1. DOSAGE QUALITATIF

Abs. de l'échantillon d'essai

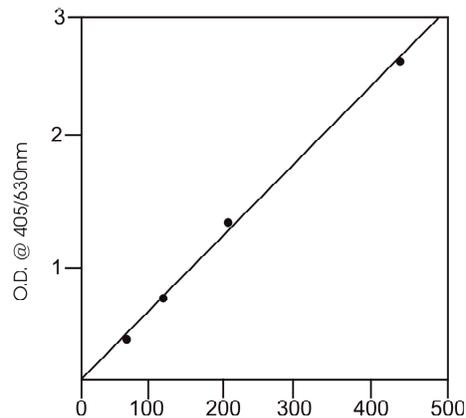
----- X IU/ml de l'étalon D = IU/ml échantillon d'essai

Abs. de l'étalon D

Déterminer le IU/ml approximatif de l'échantillon patient en ayant recours au calcul ci-dessus. Les patients doivent être dépistés uniquement comme positifs ou négatifs, en utilisant la modalité qualitative de calcul. Les échantillons qui sont trouvés positifs en utilisant cette méthode doivent être évalués en ayant recours à la méthode semi-quantitative, ci-dessous, pour procéder à une détermination exacte des niveaux d'anticorps.

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption des étalons A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en IU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe optimale. Normalement, une régression linéaire est obtenue et est recommandée. Déterminer les concentrations des échantillons patients de la courbe par rapport à sa valeur d'absorption correspondante.



Etalon

Les étalons prêts à l'emploi [A - D] sont inclus pour fournir des valeurs quantitatives exactes [IU/ml] pour les échantillons patients et doivent être utilisés à chaque opération. L'étalon D est fourni pour les dosages qualitatifs afin de dépister les patients comme étant positifs ou négatifs seulement. Les échantillons patients qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux de l'étalon A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent en outre être dilués de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe de l'étalon quand on refait le test. Pour la détermination IU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

Interprétation

Ce qui figure ci-dessous fait uniquement fonction de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire, en utilisant aussi bien les dosages qualitatifs que quantitatifs. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales. Celles-ci peuvent varier avec la population examinée.

Valeur anti-ADN double brin	Interprétation
< 50 IU/ml	Négatif
50-60 IU/ml	Indéterminé (cas limite)
> 60 IU/ml	Positif

LIMITES DE LA PROCEDURE

Le test ne doit pas être réalisé sur des échantillons grossièrement hémolysés, contaminés du point de vue microbien ou lipémiques. Cette méthode doit être utilisée uniquement pour le test d'échantillons de sérum humain. Quand les résultats du test se présentent comme un cas limite, un test supplémentaire est conseillé :

- Anticorps antinucléaires - cellules HEp-2
- Anticorps antinucléaires – sections de tissu de foie ou de rein de souris



- Anti-ENA - RNP, Sm, SS-A(Ro), SS-B(La)
- nADN par immunofluorescence indirecte

Les tests ci-dessus peuvent être fournis par A. Menarini Diagnostics S.r.l., on est prié de consulter le catalogue des produits.

Un test des niveaux de complément C3 et C4, CH50 et des complexes immuns est également conseillé. Des résultats nettement positifs sont indicatifs de SLE. Cependant, des résultats négatifs ne sont pas en mesure d'éliminer catégoriquement un diagnostic de lupus érythémateux systémique (SLE). Quand on soupçonne fortement l'existence d'un SLE, d'autres tests, tels que les anticorps antinucléaires anti-ENA, anti-nADN par immunofluorescence et niveaux de complément doivent également être envisagés. Les résultats obtenus servent seulement comme aide dans le diagnostic et ne devraient pas être interprétés comme un diagnostic par eux-mêmes.

VALEURS ATTENDUES

Incidence des anticorps anti ADN double brin

Maladie	Incidence %
Lupus érythémateux systémique	50-55
Maladie rénale active	89
Maladie non rénale active	56
Maladie inactive	30
SLE possible	32
Polyarthrite rhumatoïde	0
Sclérodémie systémique	0
Patients normaux	0

Note : L'incidence des anticorps de l'ADN double brin ci-dessus correspond à une compilation de la littérature ^{3,7}. L'incidence varie selon la population des patients.

DONNEES DE RENDEMENT

Le test Menarini™ anti-ADN double brin a été comparé avec un kit de test par immunofluorescence pour la détection des anticorps de l'ADN double brin dans le sérum humain disponible dans le commerce.

Un total de 57 sérums a été obtenu d'un laboratoire de référence clinique. Ils ont été identifiés comme positif ou négatif pour les anticorps anti-ADN double brin par immunofluorescence indirecte et ont été testés conformément aux procédures recommandées par le fabricant. Les résultats sont repris dans le tableau :

Comparaison de Menarini™ ADN double brin avec un kit de test par immunofluorescence indirecte pour la détection des anticorps de l'ADN double brin

		Menarini™		Total
		Positif	Négatif	
AUTRES TEST	Positif	15	4	19
	Négatif	3	35	38
	Total	18	39	57

Concordance : 88%
 Sensibilité : 83%
 Spécificité : 92%


Précision :

Deux sérums positifs ADN double brin ont été testés avec Menarini™ DS DNA ELISA pour déterminer la variabilité inter et intra-essai. Les résultats sont les suivants :

	inter-essai	intra-essai
	%CV	%CV
Échantillon 1	5,2	4,4
Échantillon 2	3,4	10,9

Récupération :

Des échantillons avec des concentrations d'ADN double brin connues ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon positif contenant des quantités connues d'ADN double brin. Les niveaux d'ADN double brin des échantillons mélangés ont été déterminés et le pourcentage de récupération calculé sur la base des valeurs obtenues. Les résultats sont les suivants :

	conc. ADN double brin ajouté (IU/ml)	conc. ADN double brin obtenu (IU/ml)	% Récupération
Échantillon 1	178,5	192,9	108,1
Échantillon 2	148,5	152,5	102,7
Échantillon 3	89,0	88,1	99,0



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. PI4120 CEI M

