



Anticorps anti-histone (AHA) ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 38102 Anticorps Histone (AHA) ELISA 96 Tests

USAGE PRÉVU

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA destinée à la détection et à la semi-quantification des anticorps anti-histone dans le sérum humain.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les anticorps de l'histone, une protéine associée à l'ADN dans le noyau des cellules eucaryotiques, se manifestent dans plusieurs conditions cliniques mais essentiellement dans le lupus érythémateux systémique (SLE), le lupus érythémateux provoqué par des médicaments et chez les patients avec anticorps antinucléaire positif provoqué par des médicaments¹⁻⁸. Il existe plusieurs essais pour la détection des anticorps anti-histone mais l'immunofluorescence indirecte et la méthode ELISA paraissent être plus spécifiques et ont été utilisés le plus fréquemment¹⁻⁸. Les méthodes par immunofluorescence indirecte, bien que spécifique pour l'anticorps anti-histone, ne peuvent être utilisées avec du sérum qui contient des anticorps anti-ADN. De plus, les anticorps anti-histone H3 et H4 ne sont pas détectés par la méthode de l'immunofluorescence indirecte. À cause des limites que présente ce dernier essai, la méthode ELISA est la méthode préférée pour la détection des anticorps anti-histone.

Les anticorps anti-histone se manifestent dans approximativement 50% du sérum non sélectionné de lupus érythémateux systémique et chez 83% des patients souffrant d'un lupus systémique érythémateux en cours⁶. Pratiquement tous les patients souffrant d'un lupus provoqué par médicaments et 22% des patients avec anticorps anti-nucléaires provoqués par médicaments sont positifs pour les anticorps anti-histone¹. En plus du lupus érythémateux idiopathique et provoqué par des médicaments les anticorps anti-histone se manifestent aussi chez approximativement 10-15% des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde et chez les patients souffrant d'une connectivité mixte (MCTD) et de sclérodémie. Les niveaux des anticorps anti-histone sont beaucoup plus élevés dans le lupus érythémateux idiopathique et provoqué par médicaments comparés à la polyarthrite rhumatoïde, à la connectivité mixte et à la sclérodémie.

Avec l'apparition de la méthode ELISA, on a constaté que les anticorps anti-histone sont aussi bien d'isotypes IgG qu'IgM. Dans le lupus érythémateux systémique, aussi bien des anticorps anti-histone IgG qu'IgM se manifestent. Une corrélation entre les niveaux d'anticorps anti-histone IgG et la gravité du lupus a également été signalée³⁻⁶. Cependant, dans le lupus érythémateux provoqué par médicaments, l'incidence des anticorps anti-histone de chaque classe varie. Par exemple, dans le lupus érythémateux provoqué par la procaïnamide et l'hydralazine, les anticorps anti-histone sont essentiellement de la classe IgM⁴.

PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Le test anticorps anti-histone est réalisé sous la forme d'un dosage immunologique sur phase solide (ELISA). Des microplaques à puits sont enduites avec des antigènes histone, suivi d'un blocage des sites inaltérés pour réduire l'agglutination non-spécifique. Les régulateurs, les calibreurs et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits enduits d'antigène qui permettent aux anticorps anti-histone 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 un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain aux puits. Ces anticorps conjugués à l'enzyme se lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine. Le conjugué enzyme non-lié est éliminé par lavage. La phosphatase alcaline et son substrat spécifique (pNPP) est ensuite ajoutée aux puits et la présence d'anticorps de l'histone est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion de substrat pNPP. 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 ELISA (EU)/ml.



RÉACTIFS

Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2°-8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas utiliser si les réactifs ne sont pas clairs ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20°-25°C) avant l'usage. Quand elle est entreposée à 2°-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration du kit. Reconstituer la solution de lavage dans 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

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. 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 ces matériaux¹².

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 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 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 Histone (AHA) ELISA **REF** 38102

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun

| | | |
|------------|---|--|
| 12 x 8 | MICROPLATE AHA | Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène histone |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR A AHA * | Etalon A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-histone. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR B AHA * | Etalon B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-histone. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR C AHA * | Etalon C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-histone. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR D AHA * | Etalon D (<i>couvercle jaune</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-histone. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL + AHA * | Contrôle positif (<i>couvercle rouge</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-histone. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL - * | Contrôle négatif (<i>couvercle blanc</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain. |
| 1 x 12 ml | IgG/IgM-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

IVD 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 de test
- 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 630 nm.

Nettoyeur automatique de microplaque en mesure de dispenser 200 µl

RÉCOLTE DES SPÉCIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens 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 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 échantillons de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROCÉDURE

Notes de procédure

Avant de commencer l'essai, il faut lire avec soin la brochure qui accompagne 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 patient 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 effectué de manière adéquate en dirigeant un flux énergétique 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 doit 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.

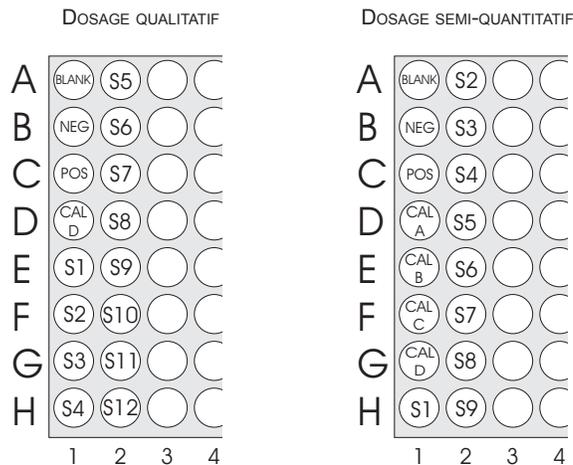
Méthode de test

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

Étape 2 Étiqueter le feuillet de protocole pour indiquer l'emplacement des échantillons dans les puits. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.

Étape 3 Pour une détermination qualitative, utiliser seulement le Calibreur Bas D prêt à l'emploi (*fiolle avec couvercle jaune*).

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



Étape 4 Préparer une dilution **1:101** des échantillons patient en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec **0,5 ml** de diluant de sérum.

Étape 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.

Étape 6 Pipeter **100 µl** des calibreurs 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 à blanc. Mettre le lecteur ELISA à zéro par rapport au réactif à blanc.

Étape 7 Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

Étape 8 Laver **4x** avec de la solution de lavage. Pour le lavage manuel, remplir chaque micropuits d'une solution de lavage reconstituée. Éliminer 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.

- Étape 9** Pipeter **100 µl** de conjugué dans les microplaques à puits.
- Étape 10** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 11** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 8.
- Étape 12** Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrer comme pour le conjugué.
- Étape 13** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 14** Pipeter **100 µl** 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.
- Étape 15** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou a double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

Des calibreurs, des régulateurs positif et négatif et un réactif à blanc doivent être utilisés à chaque test pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif à blanc doit être inférieure à 0,3. Le calibreur A doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le régulateur négatif doit être inférieur à 20 EU/ml Si l'essai est effectué en double, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer la concentration d'anticorps anti-histone. Quand on procède aux tests qualitatifs, la densité optique du Calibreur D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs s'inscrivant dans la plage figurant sur la fiole.

RÉSULTATS

Calculs

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

1. DOSAGE QUALITATIF

Abs. de l'échantillon d'essai

----- X EU/ml de calibreur D = EU/ml échantillon d'essai

Abs. du calibreur D

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption du Calibreur A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en EU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe meilleure. Déterminer les concentrations des échantillons de patient de la courbe par rapport à sa valeur d'absorption correspondante.

Calibreur

Les calibreurs prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patient qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux du calibreur 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 du calibreur quand on refait l'essai. Pour la détermination EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.



Interprétation

Les valeurs de cut-off ont été obtenues en testant le sérum sur 100 donateurs du sang normaux à la recherche d'anticorps anti-histone AHA. Les niveaux de cut-off ont été établis en déterminant la moyenne EU/ml. Les valeurs inférieures à 2 SD de cette valeur normale ont été considérées comme négatives et les valeurs entre 2-3 SD comme étant équivoques. Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales. Celles-ci peuvent varier en fonction de la population examinée.

Interprétation de la valeur AHA

- < 20 EU/ml Négative
- 20-25 EU/ml Indéterminée (cas-limite)
- >25 EU/ml Positive

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Le test Menarini™ AHA ne devrait pas être exécuté sur des échantillons grossièrement hémolysés, contaminés du point de vue microbien ou lipémiques. Cette méthode doit uniquement être utilisée pour le test d'échantillons de sérum humain. Les résultats obtenus servent seulement comme aide dans le diagnostic et ne devraient pas être interprétés comme un diagnostic par eux-mêmes.

VALEURS ATTENDUES

L'incidence des AHA dans différents types de maladie est fournie ci-dessous :

Incidence des anticorps anti-histone

| Incidence | maladie % |
|---|------------------|
| Lupus érythémateux systémique | 42 |
| Lupus érythémateux provoqué par des médicaments | 100 |
| Anticorps anti-nucléaires provoqués par des médicaments ANA | 22 |
| Polyarthrite rhumatoïde | 15 |
| Sclérodermie | 10 |
| Connectivité mixte | 15 |
| Syndrome de Sjögren | 28 |
| Patients normaux | 0 |

DONNÉES DE RENDEMENT

Précision :

Le coefficient de variation intra et inter-dosage du système de test AHA a été déterminé en prenant des échantillons positifs de divers niveaux d'AHA et est apparu comme se situant entre 5-10%.

| AHA EU/ml | % C.V. |
|------------------|---------------|
| intra-dosage | |
| 66,0 | 6,9 |
| 93,0 | 9,5 |
| 72,0 | 7,2 |
| inter-dosage | |
| 83,8 | 9,3 |
| 73,3 | 5,2 |



Le kit de test AHA Menarini™ a été comparé avec un kit de test anti-histone ELISA disponible dans le commerce. Un total de 129 sérums, identifiés comme étant positifs ou négatifs par immunofluorescence de l'anticorps de l'histone par un laboratoire de référence clinique ont été obtenus et testés simultanément avec les deux kits. Les conditions cliniques des patients n'étaient pas connues. Tous les sérums ont été testés d'après les procédures de réalisation et de qualité recommandées par le fabricant. La spécificité relative, la sensibilité relative et l'accord sont fournis dans le tableau suivant :

| | | Comparaison entre les méthodes AHA ELISA Menarini™ AHA | | |
|----------------|---------|---|---------|-------|
| | | Positif | Négatif | Total |
| Autre ELISA | Positif | 36 | 4 | 40 |
| | Négatif | 14 | 75 | 89 |
| | Total | 50 | 79 | 129 |

Accord: 86%
 Sensibilité: 90%
 Spécificité: 84%

REFERENCES • BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Epstein A, Greenberg M, Halbert S, Kramer L and Barland P. The clinical application of an ELISA technique for the detection of anti-histone antibodies. *J Rheumatol* 13:304-307, 1986.
2. Cohen MG, Pollard KM, Webb J. Antibodies to histone in systemic lupus erythematosus, prevalence, specificity and relationship to clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis* 51:61-66, 1992.
3. Gompertz NR, Isenberg DA, Turner BM. Correlation between clinical features of systemic lupus erythematosus and levels of anti-histone antibodies of the IgG, IgA, and IgM isotypes. *Ann Rheum Dis* 49:524-527, 1990.
4. Rubin RL. Antihistone antibodies. In "Systemic Lupus Erythematosus", Lahita RG, Ed, Wiley, New York, 271-289, 1987.
5. Portanova JP, Rubin RL, Joslin FG, Agneloo VD, Tan EM. Reactivity of antihistone antibodies induced by procainamide and hydralazine. *Clin Exp Immunol* 25:67-79, 1982.
6. Gioud M, Aitkaci M, Monier JC. Histone antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum*: 25:407-413, 1982.
7. Costa O, Monier JC. Anti-histone antibodies detected by ELISA and immunoblotting in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 13:722-725, 1986.
8. Aitkaci, Monier JC, Mamelle N. Enzyme-linked immunosorbent assay for anti-histone antibodies and their presence in systemic lupus erythematosus sera. *J Immun Methods* 44:311-322, 1987.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, (HHS Pub. No. (CDC) 93-8395) 1993.



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. PI4119 CE M

