



SYSTÈME DE TEST ADN natif COLORZYME® **Pour utilisation diagnostique in vitro** **Pour l'Usage Professionnel**

UTILISATION PRÉVUE: Il s'agit d'un test immuno-enzymatique indirect pour la détection semi-quantitative des anticorps anti-ADN natif dans le sérum humain. Ce système de test doit être utilisé comme une aide au diagnostic du lupus érythémateux disséminé.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Anticorps anti-nucléaire (ANA) est un terme général utilisé pour décrire les auto-anticorps dirigés contre diverses protéines nucléaires. Les premières études portant sur ces auto-anticorps, à l'aide de techniques d'immunofluorescence, ont révélé quelques spécificités des protéines nucléaires (1). La corrélation entre la positivité des tests ANA et le lupus érythémateux disséminé (LED) étant très élevée, un test ANA négatif exclut, de fait, cette maladie (2).

Bien que la présence d'anticorps anti-ADN constitue toujours une forte présomption de LED (3), un certain nombre de macromolécules nucléaires (4) et cytoplasmiques (5-7) ont également été détectées et associées à d'autres collagénoses (8-10). Étant donné que certains de ces anticorps semblent avoir une utilisation diagnostique et/ou pronostique de la sclérodermie généralisée évolutive (11-12), de la connectivité mixte (13-15), du syndrome de Sjögren (16-17), de la polymyosite (18) et de la polyarthrite rhumatoïde (19), le test ANA est maintenant reconnu comme un outil d'analyse général de la collagénose (20).

Les patients atteints d'un LED peuvent produire des anticorps contre plusieurs antigènes nucléaires. Toutefois, les anticorps anti-Sm (antigène Smith) et anti-ADNn présentent la plus forte corrélation avec la maladie (20). Les anticorps anti-Sm présentent une image mouchetée, tandis que les anticorps anti-ADN natif présentent généralement une image homogène. Bien que de faibles taux d'anticorps anti-ADN natif soient souvent présents dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, du syndrome de Sjögren, de sclérodermie généralisée évolutive, de dermatomyosite, de lupus érythémateux discoïde et de connectivité mixte (21), des taux élevés d'anticorps anti-ADNn sont observés presque exclusivement chez les patients atteints de LED. Les anticorps anti-ADN natif sont considérés comme étant impliqués dans la pathogenèse des variantes les plus graves du LED lorsqu'ils sont déposés comme complexes immuns (22). Les anticorps anti-ADN natif sont observés à titrage élevé et, étant donné qu'ils sont corrélés à l'activité de la maladie (23), leur détection est importante dans la prise en charge des patients souffrant de LED.

L'immunofluorescence indirecte s'avère être un problème pour certains laboratoires, en raison de la petite taille de l'organisme *Crithidia luciliae*, à moins qu'un équipement optique et fluorescent d'excellente qualité ne soit utilisé. Pour cette raison et face à la nécessité de réduire les problèmes de reproductibilité entre laboratoires, inhérents à la microscopie en fluorescence, Immuno Concepts a développé le système ADNn Colorzyme®.

L'anticorps du sérum qui réagit à l'ADNn est détecté par fluorescence du kinétoplaste dans l'organisme *Crithidia luciliae* (24). *C. luciliae* est un parasite de la mouche à viande non pathogène pour l'homme. Le kinétoplaste de ces flagellés parasites du sang fait partie de la grosse mitochondrie dans laquelle l'ADNn hélicoïdal est concentré (24-25). Dans les micrographies électroniques, le kinétoplaste apparaît comme une structure en forme de disque, légèrement concave contenant des crêtes de mitochondries et une masse d'ADN fibreux (26). Le kinétoplaste se trouve entre le noyau situé au centre et le corps basal du flagelle. Étant donné que l'ADN natif du kinétoplaste ne contient pas de contaminants à ADN simple brin, les éventuels problèmes de réactions faussement positives à

l'ADN simple brin, qui peuvent survenir lors du radio-immunodosage de l'ADN de thymus de veau, sont quasiment éliminés (25, 27-31).

PRINCIPE DU TEST

Le système de test ADN natif Colorzyme® d'Immuno Concepts utilise la technique immuno-enzymatique indirecte. Les échantillons des patients sont mis à incuber avec le substrat antigénique afin de permettre la liaison spécifique des auto-anticorps à l'ADN natif du kinétoplaste. En présence d'anticorps anti-ADN natif, un complexe antigène-anticorps stable se forme. Après le rinçage destiné à éliminer les anticorps non liés spécifiquement, le substrat est mis à incuber avec un réactif d'anticorps anti-humain conjugué à de la peroxydase de raifort. Lorsque les résultats sont positifs, on observe la formation d'un complexe tripartite stable composé d'un anticorps à marquage enzymatique lié à un anticorps anti-ADN natif humain, lui-même lié à l'antigène ADNn. Pour visualiser ce complexe, il faut mettre la lame à incuber dans un réactif coloré qui contient un substrat spécifique à l'enzyme. La réaction entre l'anticorps marqué par une enzyme et le substrat spécifique à l'enzyme se traduit par une réaction colorée sur la lame, visible par microscope optique classique. Dans les échantillons positifs, le kinétoplaste présente une coloration bleu-violet sombre dans les organismes *Crithidia luciliae*. Si l'échantillon est négatif pour l'ADNn, le kinétoplaste ne présentera aucune fluorescence.

COMPOSITION DES SYSTÈMES - MATÉRIELS FOURNIS

Utilisation: Tous les composants sont prêts à l'emploi et ne requièrent ni aliquotage ni reconstitution (sauf pour le tampon PBS et le réactif coloré Colorzyme® qui doivent être dissous dans une eau désionisée ou distillée avant utilisation).

Conservation: Tous les composants doivent être conservés au réfrigérateur entre 2 et 10°C. Après reconstitution, le réactif tampon PBS doit être conservé dans un récipient fermé, au réfrigérateur entre 2 et 10°C. Après reconstitution, le réactif coloré Colorzyme® doit être conservé dans un récipient fermé à température ambiante, pendant 30 jours maximum. En fonction de la fréquence d'utilisation, 150 ml de réactif coloré Colorzyme® peuvent être utilisés avec vingt lames maximum.

Stabilité: Tous les composants sont stables pendant 12 mois à partir de la date de fabrication. Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.

RÉACTIFS

Lames de substrat: Lames de substrat d'ADNn utilisant des *Crithidia luciliae* stabilisées directement sur les puits du test. Le concept unique de la lame recouverte de téflon (Moat) évite toute contamination croisée entre les puits pendant le test. Le sachet de la lame contient un gaz inerte non toxique qui contribue à la stabilité des cellules. Si le sachet ne semble pas gonflé lorsque la lame est sortie du kit, il a sans doute été endommagé et la lame ne doit pas être utilisée.

Contrôle positif: Réf. catalogue 3021. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain positif riche en anticorps spécifiques aux antigènes ADNn. On observe une image fluorescente positive du kinétoplaste ou du kinétoplaste et du noyau du sérum sur le substrat *Crithidia luciliae* d'Immuno Concepts.

Sérum de contrôle titrable: Réf. catalogue 3026. Flacon prêt à l'emploi contenant 0,5 ml de sérum de contrôle humain positif, qui doit être traité comme un échantillon patient pur (non dilué). Voir l'étiquette du flacon pour connaître le titre.

Sérum de contrôle négatif: Réf. catalogue 3031. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain négatif. Le sérum de contrôle négatif ne présentera pas de fluorescence spécifique du kinétoplaste sur le substrat *Crithidia luciliae* d'Immuno Concepts.

Réactif immuno-enzymatique: Réf. catalogue 5009 (9,0 ml), 5075 (23,0 ml). Globuline de chèvre anti-IgG humaine (chaînes lourdes et légères) couplée à de la peroxydase de raifort (HRP). Les kits de test complets comprennent des flacons compte-gouttes de précision prêts à l'emploi. Chaque flacon contient 9,0 ml de réactif, soit la quantité suffisante pour 10 lames.

Réactif coloré: Réf. catalogue 4066. Poudre de substrat enzymatique spécifique à la HRP, contenant du 4-chloro-1-naphtol. Chaque paquet contient suffisamment de poudre pour préparer 150 ml de réactif coloré Colorzyme® auto-activant.

Préparation: Dissoudre le contenu d'un sachet dans 150 ml d'eau désionisée ou distillée. Bien mélanger jusqu'à dissolution complète. Ce réactif coloré, conservé dans un récipient fermé, est stable pendant 30 jours à température ambiante. Il peut être réutilisé pendant 30 jours ou jusqu'à observation d'un changement de couleur ou d'un précipité. L'aspect trouble ou l'opalescence, si aucun précipité n'est visible lors de la réutilisation, est normal. En fonction de la fréquence d'utilisation, 150 ml de réactif Colorzyme® peuvent être utilisés avec vingt lames maximum.

COMPOSANTS NON RÉACTIFS

Poudre tampon PBS: Réf. catalogue 1011. Solution saline en poudre tamponnée au phosphate en poudre (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Chaque sachet contient une quantité suffisante de poudre tampon pour préparer 1 litre de solution. (Chaque kit de test complet contient un sachet de poudre tampon pour cinq lames.)

Préparation: Dissoudre un sachet de poudre tampon dans 1 litre d'eau désionisée ou distillée, couvrir puis conserver au réfrigérateur entre 2 et 10°C pendant quatre semaines maximum ou jusqu'à ce que des signes de contamination ou de modifications visibles apparaissent.

Milieu de montage semi-permanent: Réf. catalogue 1111. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 5,0 ml de milieu de montage à base de glycérol.

Lamelles couvre-objet: Réf. catalogue 1042. Chaque paquet contient dix lamelles couvre-objet en verre n°1 de 24 x 64 mm.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE REQUIS - MAIS NON FOURNI

Pipettes volumétriques permettant de prélever 20 à 25 µl
Trois jarres Coplin ou cuves à coloration
Pissette en plastique ou pipettes Pasteur
Pipettes sérologiques
Récipients à bouchon à vis d'un litre (pour tampon PBS)
Conteneur fermé pour conserver le réactif coloré Colorzyme®
Eau désionisée ou distillée
Tubes à essai pour effectuer les dilutions successives
Papier absorbant ou serviettes en papier
Chambre d'incubation
Gants jetables
Chronomètre de laboratoire
Microscope classique à grossissement 200X et 400X

PRÉCAUTIONS

1. Tous les matériels d'origine humaine utilisés dans la préparation des contrôles pour ce produit ont été testés et se sont révélés négatifs (non-réactivité répétée) vis-à-vis des anticorps des virus de l'immunodéficience humaine 1 et 2 (VIH 1 et 2), de l'anticorps du virus de l'hépatite C (HCV) et de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBSAg), selon les méthodes approuvées par la FDA. Aucune méthode de test ne peut assurer totalement l'absence de VIH-1, VIH-2, virus de l'hépatite C, virus de l'hépatite C ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, tous les sérums de contrôle doivent être manipulés de la même manière que des matériels considérés comme potentiellement infectieux.
2. Tous les échantillons de patient doivent être manipulés conformément aux recommandations du niveau de biosécurité 2 comme pour tout échantillon de sérum ou de sang humain potentiellement infectieux, telles qu'indiquées dans le manuel du Centers for Disease Control/National Institutes of Health : *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La dilution des composants ou l'utilisation de composants autres que ceux fournis dans ce système peut donner lieu à des résultats incohérents.
4. L'azide de sodium (0,09%) est utilisé comme conservateur. Il est possible que l'azide de sodium réagisse au contact des canalisations en plomb ou en cuivre et forme des sels d'azides métalliques explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer abondamment les canalisations avec de l'eau afin d'éviter toute accumulation de résidus. L'azide de sodium est un poison et peut être toxique en cas d'ingestion.
5. Ce kit est destiné à une utilisation diagnostique *in vitro*.
6. En cas d'utilisation de sérums hémolysés ou lipémiques, il est conseillé de procéder à une inactivation de 30 minutes à 56°C pour obtenir des résultats optimaux. Ne pas utiliser les sérums contaminés d'un point de vue microbien.
7. Le sérum de contrôle titrable est destiné à être utilisé pour surveiller la reproductibilité inter-lot et inter-analyse. Il n'est pas destiné à mesurer la sensibilité ou la spécificité globale du dosage.

8. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
9. Éviter toute éclaboussure ou pulvérisation d'aérosols à tout moment.
10. Les durées et températures d'incubation autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés.
11. La contamination croisée des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
12. Avant utilisation, la verrerie réutilisable doit être lavée et rincée soigneusement afin d'éliminer tout détergent. Toute la verrerie doit être propre et sèche avant utilisation.
13. Avant utilisation, porter les réactifs, lames et échantillons à température ambiante (18-24°C).
14. Mettre des gants jetables pour manipuler les échantillons et les réactifs puis se laver soigneusement les mains en fin de procédure technique.
15. La contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
16. Ne jamais pipeter avec la bouche et éviter tout contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs et les échantillons. En cas de contact, laver abondamment avec un savon germicide et de l'eau.
17. Le réactif coloré peut être réutilisé pendant 30 jours ou jusqu'à observation d'un changement de couleur ou d'un précipité. L'aspect trouble ou l'opalescence, si aucun précipité n'est visible lors de la réutilisation, est normal. En fonction de la fréquence d'utilisation, 150 ml de réactif coloré Colorzyme® peuvent être utilisés avec vingt lames maximum.

PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

Prélèvement: Le sérum est l'échantillon préférentiel. Environ 5 ml de sang entier doivent être prélevés de manière aseptique par ponction veineuse à l'aide d'un tube à prélèvement sous vide stérile ou tout autre système de prélèvement adapté. Laisser le sang coaguler à température ambiante (18-24°C). Le sérum doit être séparé du caillot par centrifugation aussi rapidement que possible, de façon à limiter l'hémolyse.

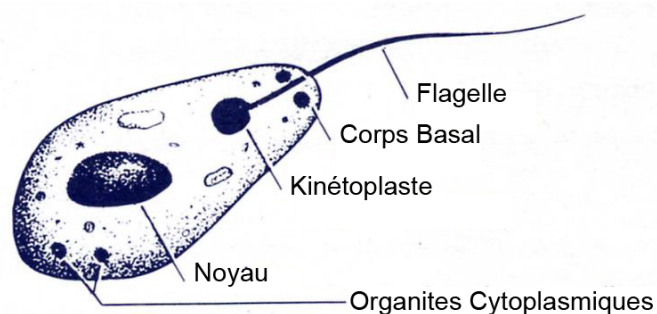
Substances interférentes: Les sérums présentant un degré élevé d'hémolyse, d'ictère, de lipémie ou de prolifération microbienne doivent être écartés car ces anomalies peuvent engendrer des résultats aberrants. Les échantillons contenant des particules visibles doivent être clarifiés par centrifugation avant de procéder au test.

Conservation: Les sérums peuvent être conservés entre 2 et 10°C pendant une semaine maximum. Si le test est reporté, ils doivent être congelés à -20°C minimum. Le sérum ne doit pas être conservé dans un réfrigérateur ou un congélateur à dégivrage automatique.

ATTENTION: Les congélations et décongélations successives des échantillons de patient peuvent induire des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'interprétation des résultats dépend de l'identification des diverses caractéristiques morphologiques de *Crithidia luciliae*.



Le revêtement extérieur de la plupart des protozoaires est une pellicule composée de lipoprotéines. Dans la pellicule se trouve la membrane plasmique. La membrane plasmique renferme le cytoplasme consistant en a) une couche ectoplasmique externe contenant le corps basal et le flagelle et b) l'endoplasme, un cytoplasme interne très fluide contenant le noyau, le kinétoplaste et les autres organites.

La pellicule, la membrane plasmique, le corps basal et le flagelle sont généralement considérés comme des éléments permanents de l'organisme, dont l'emplacement varie peu d'une cellule à l'autre. Bien que le kinétoplaste se situe généralement plus près du corps basal que du noyau, l'emplacement exact de cet organite peut varier d'une cellule à l'autre en raison de la fluidité de l'endoplasme.

Afin de clairement différencier le kinétoplaste du noyau, examiner le puits du contrôle positif. Le kinétoplaste sera toujours plus près du flagelle (illustration ci-dessus). Le puits du contrôle négatif ne présente aucune fluorescence du kinétoplaste, contrairement à celui du contrôle positif.

NE LIRE QUE LES ORGANISMES SIMPLES BIEN DÉFINIS DANS CHAQUE CHAMP. LA MORPHOLOGIE PEUT VARIER D'UN ORGANISME À L'AUTRE EN RAISON DE LA FIXATION PENDANT LA PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les contrôles positif, négatif et PBS doivent être effectués dans les puits dédiés au contrôle qualité sur chaque lame. Le contrôle positif doit présenter une fluorescence bleu-violet sombre du kinétoplaste des *Crithidia luciliae*, avec ou sans coloration du noyau. Le contrôle négatif ne présente aucune fluorescence du kinétoplaste. Le contrôle PBS est utilisé pour observer la fluorescence non spécifique par le réactif anticorps et ne doit pas présenter de coloration bleue. Si les contrôles n'apparaissent pas tel que décrit, le test n'est pas valable et doit être recommencé.

CONTRÔLE TITRABLE OPTIONNEL

Lors de la lecture des titres, de nombreux laboratoires commencent par lire le puits qui contient l'échantillon le plus dilué puis poursuivent « à rebours » jusqu'à la dilution 1:10. Le premier puits dans lequel une fluorescence du kinétoplaste clairement perceptible est visible est le résultat du titrage. Nous recommandons cette technique pour la détermination des résultats de titrage.

Le titre moyen et la plage de titrage (\pm une double dilution de part et d'autre de la moyenne) déterminés pour ce numéro de lot ont été établis dans notre laboratoire et sont communiqués à titre indicatif. Ce contrôle est fourni pour permettre à chaque laboratoire d'évaluer la reproductibilité (précision) de son test ADNn. Étant donné que ce contrôle n'est pas destiné à être un indicateur de la précision du titrage, chaque laboratoire doit établir sa propre référence de titrage moyen pour cet échantillon et utiliser cette information pour évaluer la reproductibilité inter-analyse (précision).

Par de multiples dosages de ce contrôle titrable réalisés à l'aide du système de test ADNn Colorzyme® d'Immuno Concepts, une valeur de titre moyen a été établie pour chaque numéro de lot. Le numéro de lot, le titre moyen et la plage de titrage (\pm une double dilution de part et d'autre de la moyenne) sont indiqués sur l'étiquette du flacon et doivent être utilisés à titre indicatif.

Les valeurs obtenues dans notre laboratoire peuvent différer de vos propres valeurs. De nombreux facteurs peuvent affecter vos résultats, notamment les éléments suivants:

1. Alignement correct de l'axe optique du microscope. Pour les instructions, se reporter au manuel du microscope.
2. Ouverture numérique de l'objectif. L'ouverture numérique est liée au pouvoir collecteur de lumière et à la résolution de l'objectif. Ce chiffre est imprimé sur le côté de l'objectif.
3. Précision et exactitude de la technique de dilution, de l'équipement et de la réalisation des procédures de test.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU PATIENT

Un grossissement total de 400X est recommandé pour la visualisation des *Crithidia*.

Négatifs: Un sérum est considéré comme négatif aux anticorps anti-ADN natif lorsque la fluorescence du kinétoplaste est inférieure ou égale à celle observée pour le puits du contrôle négatif. Une fluorescence nucléaire, sans coloration du kinétoplaste, est également considérée comme négative aux anticorps anti-ADN natif.

Positifs: Un échantillon de sérum est considéré comme positif si le kinétoplaste présente une fluorescence clairement visible, supérieure à celle du puits du contrôle négatif.

Titres: Lors de la lecture des titres, de nombreux laboratoires commencent par lire le puits qui contient l'échantillon le plus dilué puis poursuivent « à rebours » jusqu'à la dilution 1:10. Le premier puits dans lequel une fluorescence du kinétoplaste clairement perceptible constitue le résultat du titrage. Nous recommandons cette technique pour la détermination des résultats du titrage.

INTENSITÉ DE LA FLUORESCENCE ENZYMATIQUE

Le degré d'intensité de la fluorescence n'a pas de valeur clinique avérée et n'est qu'un indicateur limité du titre (32). Pour simplifier l'interprétation, enregistrer les résultats du test comme étant fortement positifs ou positifs et le titre en fonction de cela.

Réaction fortement positive: Fluorescence bleu-violet sombre à très sombre avec un contour net du kinétoplaste.

Réaction positive: Fluorescence bleu-violet faible ou voilée avec une plus grande variabilité de la fluorescence entre les organismes. Le contour des cellules peut être moins bien défini pour certains organismes avec une majorité d'organismes présentant toujours une fluorescence clairement visible du kinétoplaste.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Test: Les résultats doivent être notés fortement positifs, positifs ou négatifs à la dilution 1:10.

Titrage: Les résultats doivent être communiqués comme la dernière des dilutions successives dans laquelle une coloration du kinétoplaste est clairement visible. Les résultats présentant une forte réaction à la dilution 1:640 doivent être notés supérieurs à 1:640.

CARACTÉRISTIQUES DE FLUORESCENCE

Kinétoplaste: Fluorescence lisse ou périphérique du kinétoplaste située près de la région flagellaire de l'organisme.

Résultat: Positif aux anticorps anti-ADNn.

Antigènes: ADN natif.

Associations cliniques: Les titres élevés suggèrent un LED (20) ou, en cas de LED précédemment diagnostiqué, une maladie récurrente ou une absence de réaction au traitement (21-23).

Noyau: Fluorescence lisse, périphérique ou mouchetée du noyau.

Résultat: Négatif aux anticorps anti-ADNn.

Antigènes: Antigènes associés au noyau (21-23).

Associations cliniques: La collagénose non spécifique peut être indiquée par une fluorescence nucléaire positive.

REMARQUE: Les résultats ANA positifs sur HEP-2 ou autres substrats ne donnent généralement pas la fluorescence nucléaire correspondante sur *C. luciliae*, par exemple un aspect ANA moucheté sur HEP-2 ne présente pas de fluorescence mouchetée sur *C. luciliae*.

Corps basaux: Fluorescence lisse des deux sphères situées au point de fixation du corps de l'organisme au flagelle dans l'ectoplasme.

Synonymes: Pieds basaux.

Résultat: Négatif aux anticorps anti-ADNn.

Antigènes: Antigènes associés au corps basal.

Associations cliniques: Enregistrées chez des patients souffrant de LED ne présentant pas de fluorescence du kinétoplaste ou du noyau (33).

Flagelle: Fluorescence du flagelle de l'organisme.

Synonymes: Région de la queue de l'organisme.

Résultat: Négatif aux anticorps anti-ADNn.

Antigènes: Antigènes associés aux flagelles inconnus.

Associations cliniques: Inconnues.

LIMITES DU TEST

1. Le diagnostic ne peut pas être réalisé sur la base de la détection des anticorps anti-ADN natif seuls. Le médecin doit interpréter ces résultats au regard des antécédents et des symptômes du patient, des observations physiques et d'autres procédures de diagnostic.
2. Le traitement ne doit pas débuter sur la seule base d'un test positif aux anticorps anti-ADN natif. Les indications cliniques, les autres analyses de laboratoire et le diagnostic clinique du médecin doivent être pris en compte avant de commencer tout traitement.
3. Certains médicaments (procaïnamide, hydralazine...) peuvent provoquer des pathologies similaires au lupus érythémateux. Les patients souffrant de lupus érythémateux induit par des médicaments peuvent présenter des ANA positifs généralement dirigés contre les histones nucléaires, bien que des anticorps anti-ADN natif aient également été observés (34-35).
4. Bien qu'un ADN natif à titrage élevé fasse indéniablement penser à un LED, il ne doit pas être considéré comme un élément diagnostique mais plutôt comme faisant partie des antécédents cliniques d'un patient. Des titres faibles d'anticorps anti-ADN natif sont souvent présents dans les sérums des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, du syndrome de Sjögren, de sclérodémie généralisée évolutive, de dermatomyosite, de lupus érythémateux discoïde et de connectivité mixte (21).
5. Les patients sous traitement stéroïdien peuvent présenter des résultats négatifs aux anticorps anti-ADN natif (36).

VALEURS ESCOMPTÉES

La valeur escomptée dans la population saine est négative à une dilution de test de 1:10. Certains médicaments, tels l'hydralazine, peuvent induire une production d'anticorps anti-ADN natif (34-35).

PERFORMANCES

DÉTECTION

L'équivalence du système de test ADN natif Colorzyme® d'Immuno Concepts a été testée à l'aide du test ADN natif par immunofluorescence indirecte d'Immuno Concepts, par analyse et titrage de quarante-neuf échantillons de sérum représentant les divers auto-anticorps observés dans les maladies rhumatismales systémiques. Pour tous les sérums testés, les résultats enzymatiques correspondaient à 100% au test ADN natif immunofluorescent d'Immuno Concepts (37).

Le système de test ADN natif fluorescent d'Immuno Concepts a été préalablement comparé à deux autres tests d'immunofluorescence disponibles sur le marché (37). L'étude a porté sur 103 échantillons de sérum provenant de sujets sains ainsi que de patients atteints notamment de lupus érythémateux disséminé (LED), de connectivité mixte (MCTD), d'une variante Raynaud-sclérodémie généralisée évolutive-CREST (PSS-CREST), de polyarthrite rhumatoïde, d'arthrite rhumatoïde juvénile et d'autres collagénoses. Les sérums ont été testés aux dilutions de test recommandées pour chaque fabricant. Les résultats de l'étude sont résumés dans le tableau 1.

TABLEAU 1

DIAGNOSTIQUE	Nombre de Patients	Positivité Immuno Concepts 1:10	Fabricant A Positif 1:10	Fabricant B Positif 1:10
LED	30	13	13	11
MCTD/chevauchement	6	0	0	0
Raynaud PSS-CREST	17	0	0	0
Polyarthrite rhumatoïde	2	0	0	0
Arthrite rhumatoïde juvénile	4	0	0	0
Autres collagénoses	9	0	0	0
Sujets hospitalisés	11	1	1	1
Sujets sains	24	0	0	0

Les sujets hospitalisés positifs à tous les tests AND natif sur *Crithidia luciliae* présentaient un syndrome rénal autoimmun qui ne permet pas de poser le diagnostic de LED.

PRÉCISION

Dix sérums positifs à l'ADN natif ont été titrés à trois occasions. Dans tous les cas, tous les titres ont été reproduits à plus ou moins une double dilution près (37). Ces résultats sont conformes aux normes de précision établies par le Centers for Disease Control d'Atlanta (Georgie) pour les réactifs anticorps fluorescents.

BIBLIOGRAPHIE

1. Robbins, W. C., Holman, H. R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. California Medicine 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D. Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. J. Immunol. 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. Ann. Rheum. Dis. 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. Hum. Pathol. 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. Semin. Arthritis Rheum. 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. J. Biol. Chem. 254:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. Ann. Rheum. Dis. 38:74-78, 1979.
14. Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). Am. J. Med. 52:148-159, 1972.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, C. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. N. Engl. J. Med. 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. J. Clin. Invest. 55:1067-1073, 1975.
17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. Arthritis Rheum. 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. J. Clin. Invest. 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration by Precipitation and

Immunofluorescence. Arthritis Rheum. 19:711-719, 1976.

20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
21. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann. Int. Med. 83:464-469, 1975.
22. Stingl, G., Meingassner, J. G., Swelty, P., et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and of Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin. Immunol. Immunopathol. 6:131-140, 1976.
23. Edmonds, J. P., Johnson, G. D., Ansell, B.M., et al. The Value of Tests for Antibodies to DNA in Monitoring the Clinical Course of Systemic Lupus Erythematosus. A Long Term Study Using the Farr Test and the DNA Counterimmunoelectrophoretic Method. Clin. Exp. Immunol. 22:9-15, 1975.
24. Simpson, L. Behavior of the Kinetoplast of *Leishmania tarentolae* Upon Cell Rupture. J. Protozool. 15:132-136, 1968.
25. Aarden, L. A., DeGroot, E. R., Feltkamp, T.E.W. Immunology of DNA. III *Crithidia luciliae*, a Simple Substrate for the Determination of Anti-dsDNA with the Immunofluorescent Technique. Ann. N.Y. Acad. Sci. 254:505-515, 1975.
26. Laurent, M., van Assel, S., Steinert, M. Kinetoplast DNA. A Unique Macromolecular Structure of Considerable Size and Mechanical Resistance. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43:278-284, 1971.
27. Deegan, M. J., Walker, S. E., Lovell, S. E. Antibodies to Double Stranded DNA. A Comparison of the Indirect Immunofluorescent Test Using *Crithidia luciliae* and the DNA-Binding Assay. Am. J. Clin. Pathol. 69:599-604, 1978.
28. Feltkamp, T. E.W., van Rossum, A. L. Antibodies to Salivary Duct Cells, and Other Autoantibodies, in Patients with Sjögren's Syndrome and Other Idiopathic Autoimmune Diseases. Clin. Exp. Immunol. 3:1-16, 1968.
29. Murakami, W. T., van Vunakis, H., Grossman, L., et al. Immunochemical Studies of Bacteriophage Deoxyribonucleic Acid. II. Characterization of the Active Antigen. Virology 14:190-197, 1961.
30. Locker, J. D., Medof, M. E., Bennett, R. M., et al. Characterization of DNA Used to Assay Sera for Anti-DNA Antibodies; Determination of the Specificities of Anti-DNA Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus and Non-SLE Rheumatic Disease States. J. Immunol. 118:694-701, 1977.
31. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A. Current Status of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA) in Systemic Rheumatic Diseases. In: Immunoassays in the Clinical Laboratory. Ed. by Nakamura, R. M., Dito, W. R., Tucker, E. S., pp. 317-338. Alan R. Liss, Inc., New York, NY. 1979.
32. Nakamura, R. M., Peebles, C. L., Molden, D. P.: et al. Advances in Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases, Laboratory Med. 15:190-198, 1984.
33. Vogel, J. C., Roberts, J. L., Lewis, E. J. A Non-Anti-DNA Antibody Detected With the *Crithidia luciliae* Anti-DNA Assay. New Engl. J. Med. 303:458-459, 1980.
34. Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. J. Rheum. 2:215-220, 1975.
35. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. J. Rheum. 2:167-171, 1975.
36. Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia luciliae* Method. Arthritis Rheum. 22:321-328, 1979.
37. Data on file. Immuno Concepts, Incorporated.

Si l'emballage de protection est endommagé, veuillez contacter Immuno Concepts avant toute utilisation.



Constructeur



Représentant autorisé dans le Communauté européen



Limitation de la Température



Contient suffisamment pour <n> essais



Consultez les instructions pour l'usage



Dispositif Médical Diagnostique In vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 5000-I,

4.11.02.003.094-Fr

Rev 2.0 © Copyright 2011

PROCÉDURE DE TEST ADN NATIF COLORZYME®

- 1. RECONSTITUTION DU TAMPON (PBS)**
Dissoudre le contenu d'un sachet de tampon dans un litre d'eau désionisée ou distillée. Le tampon peut être couvert et conservé à 2-10°C pendant quatre semaines.
- 2. RECONSTITUTION DU RÉACTIF COLORÉ**
Dissoudre le contenu d'un sachet dans 150 ml d'eau désionisée ou distillée. Bien mélanger jusqu'à dissolution complète. Ce réactif coloré, conservé dans un récipient fermé, est stable pendant 30 jours à température ambiante. Il peut être réutilisé pendant 30 jours ou jusqu'à observation d'un changement de couleur ou d'un précipité. L'aspect trouble ou l'opalescence, si aucun précipité n'est visible lors de la réutilisation, est normal. En fonction de la fréquence d'utilisation, 150 ml de réactif coloré Colorzyme® peuvent être utilisés avec vingt lames maximum.
- 3. DILUTION DES ÉCHANTILLONS DES PATIENTS**
Test: Diluer les échantillons à 1:10 en ajoutant 0,1 ml (100 µl) de sérum à 0,9 ml de PBS reconstitué.
Titration semi-quantitative: Pour procéder à des doubles dilutions successives des échantillons à analyser (ex.: 1:20, 1:40, 1:80...1:640), retirer 0,5 ml de la dilution à 1:10 et la mélanger à 0,5 ml de PBS pour obtenir une dilution à 1:20 puis poursuivre de la même manière.
- 4. DILUTION DU CONTRÔLE TITRABLE OPTIONNEL**
Traiter le contrôle titrable optionnel comme un échantillon de patient non dilué. Diluer le contrôle à 1:10 en ajoutant 0,1 ml (100 µl) de sérum de contrôle à 0,9 ml de PBS reconstitué. Procéder aux doubles dilutions successives du contrôle titrable comme décrit ci-dessus.
- 5. PRÉPARATION DES LAMES DE SUBSTRAT (20-25 µl/puits)**
Sortir les lames des sachets et placer les sérums de contrôle sur les puits de contrôle comme suit: retourner le flacon compte-gouttes du contrôle et le presser légèrement jusqu'à ce qu'une goutte apparaisse à l'extrémité de l'embout. Mettre soigneusement la goutte en contact avec le puits de contrôle approprié en évitant tout contact direct de l'embout du compte-gouttes avec la surface de la lame. Ajouter 1 goutte (20-25 µl) d'échantillon du patient dans les puits numérotés.
ATTENTION: LE CONTACT DIRECT DE L'EMBOU DU COMPTE-GOUTTES AVEC LA SURFACE DE LA LAME PEUT ALTÉRER LE SUBSTRAT ANTIGÉNIQUE.
- 6. INCUBATION DES LAMES (30 minutes ± 5 minutes à température ambiante, soit 18-24°C)**
Placer les lames dans une chambre humide couverte (une boîte de Pétri avec des serviettes en papier humidifiées conviendra). Mettre à incuber, couvercle fermé, pendant 30 minutes (± 5 minutes) à température ambiante (18-24°C).
- 7. RINÇAGE EN TAMPON PBS**
Sortir les lames du plateau de l'incubateur et les rincer rapidement avec le tampon PBS à l'aide d'un flacon gicleur ou d'une pipette Pasteur ou sérologique. Ne pas asperger le tampon directement sur les puits.
REMARQUE: Afin d'éviter toute contamination croisée sur les lames à 13 puits, diriger le jet de tampon PBS le long de la ligne médiane de la lame, en l'inclinant d'abord vers les puits 1 à 5 puis vers les puits 6 à 10.
- 8. LAVAGE EN TAMPON PBS (10 minutes)**
Laver la ou les lames pendant 10 minutes avec du PBS dans une cuve à coloration ou une jarre Coplin. Ce lavage peut être prolongé de 10 à 30 minutes sans que les résultats des tests finaux n'en soient affectés. Jeter la solution de lavage PBS après utilisation.
- 9. RÉACTIF IMMUNO-ENZYMATIQUE (couvrir les puits avec 10 à 12 gouttes)**
Retirer les lames une à une du tampon PBS et les immerger 3 à 5 fois dans de l'eau désionisée ou distillée. Tapoter la tranche de la lame sur du papier absorbant ou des serviettes en papier pour éliminer l'excès d'eau. Remettre immédiatement la lame dans la chambre d'incubation et recouvrir complètement les puits de réactif immuno-enzymatique. Commencer par placer une goutte sur chaque puits. Recommencer l'opération pour chaque lame. Le réactif immuno-enzymatique a été titré de façon à compenser l'eau désionisée ou distillée résiduelle restant sur la lame après le rinçage.
REMARQUE: Il est important que les puits de la lame ne se dessèchent pas pendant cette procédure sous peine d'altérer le substrat.
NE PAS SÉCHER LA LAME OU OUBLIER DE LA RECOUVRIR DE RÉACTIF IMMUNO-ENZYMATIQUE PENDANT PLUS DE 15 SECONDES.
- 10. INCUBATION DES LAMES (30 minutes ± 5 minutes à température ambiante, soit 18-24°C)**
Placer le couvercle sur la chambre d'incubation. Laisser la ou les lames incuber pendant 30 minutes (± 5 minutes) à température ambiante (18-24°C).
- 11. RINÇAGE EN TAMPON PBS**
Sortir les lames de la chambre d'incubation et les rincer rapidement avec du PBS. Ne pas asperger le tampon directement sur les puits.
- 12. LAVAGE EN TAMPON PBS (10 minutes)**
Laver les lames pendant 10 minutes avec du PBS dans une cuve à coloration ou une jarre Coplin. Ce lavage peut être prolongé de 10 à 30 minutes sans que les résultats des tests finaux n'en soient affectés.
- 13. INCUBATION DU RÉACTIF COLORÉ (30 minutes à température ambiante, soit 18-24°C)**
Sortir les lames une à une du tampon PBS et les immerger 3 à 5 fois dans de l'eau désionisée ou distillée puis tapoter la tranche de la lame sur du papier absorbant ou des serviettes en papier pour éliminer l'excès d'eau. Placer immédiatement la ou les lames dans une jarre Coplin contenant du réactif coloré activé et incuber pendant 30 minutes.
- 14. RINÇAGE EN TAMPON PBS**
Sortir les lames une à une de la cuve à rainures et en rincer chaque côté 4 à 5 secondes avec du PBS. Ne pas asperger le tampon directement sur les puits. Placer chaque lame rincée au PBS dans une jarre Coplin remplie d'eau désionisée ou distillée jusqu'à ce que toutes les lames soient sorties du réactif coloré. Passer immédiatement à l'étape 15.
- 15. MONTAGE DE LA LAMELLE COUVRE-OBJET**
Retirer les lames une à une de l'eau désionisée ou distillée puis tapoter la tranche de la lame sur du papier absorbant ou des serviettes en papier pour éliminer l'excès d'eau.
NE PAS SÉCHER LA LAME OU OUBLIER DE LA RECOUVRIR DE LA LAMELLE COUVRE-OBJET PENDANT PLUS DE 15 SECONDES.
Ajouter 4 à 5 gouttes de milieu de montage semi-permanent sur la ligne médiane de chaque lame. Mettre soigneusement la lamelle couvre-objet en place en évitant la formation de bulles d'air; pour cela, abaisser doucement la lamelle d'un côté de la lame vers l'autre.
REMARQUE: Un excès de milieu de montage sur la lame peut entraîner un manque de résolution des cellules (image floue). Afin d'éliminer l'excès de milieu de montage sur la lame, essuyer soigneusement la lamelle couvre-objet avec du papier absorbant ou un nettoyant optique tout en évitant de déplacer la lamelle. Les lames peuvent être lues immédiatement ou conservées pendant une période prolongée entre 2 et 10°C sans perte de réactivité.

POUR L'ASSISTANCE TECHNIQUE: +1-916-363-2649
ou messagerie électronique : technicalsupport@immunoconcepts.com

