SYSTÈME DE TEST FLUORESCENT IgG ANTI-ADN NATIF

Pour utilisation diagnostique in vitro
Pour l'Usage Professionnel

UTILISATION PRÉVUE: Il s'agit d'un test immunofluorescent indirect pour l'analyse et la détection semi-quantitative des anticorps IgG 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

Les patients atteints de lupus érythémateux disséminé (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 (1). 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 peuvent être 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 (2), des taux élevés d'anticorps anti-ADN natif 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 (3). Les anticorps anti-ADN natif sont observés à titrage élevé et, étant donné qu'ils sont corrélés à l'activité de la maladie (4), leur détection est importante dans la prise en charge des patients souffrant de LED.

Divers tests sont disponibles pour la détection des anticorps anti-ADN natif. Les méthodes les plus couramment utilisées sont l'immunofluorescence indirecte, le radio-immunodosage, la contre-immunoélectrophorèse et l'immunodiffusion (5-8). Le système de test IgG anti-ADN natif d'Immuno Concepts utilise la méthode d'immunofluorescence indirecte (IFA). L'anticorps du sérum qui réagit à l'ADNn est détecté par fluorescence du kinétoplaste dans l'organisme *Crithidia luciliae* (9). *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 (9-10). 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 (11). 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 (12-16).

Principe du Test

Le test IgG anti-ADN natif d'Immuno Concepts utilise la technique d'immunofluorescence indirecte initialement décrite par Weller et Coons (17). Les échantillons du patient sont mis à incuber avec le substrat antigénique afin de permettre la liaison spécifique des auto-anticorps et 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 spécifiques, le substrat est mis à incuber avec un réactif d'anticorps anti-humain conjugué à de la fluorescéine. Lorsque les résultats sont positifs, on observe la formation d'un complexe tripartite stable composé d'un anticorps fluorescent lié à l'anticorps anti-ADNn humain, lui-même lié à l'antigène ADNn. Ce complexe peut être visualisé à l'aide d'un microscope à fluorescence. En cas de positivité de l'échantillon, le kinétoplaste ou le kinétoplaste et le

noyau présentent une fluorescence vert pomme intense dans les organismes *Crithidia luciliae*. Si l'échantillon est négatif aux anticorps IgG anti-ADN natif, aucune fluorescence n'est observée dans le kinétoplaste.

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 qui doit 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 tampon PBS doit être conservé dans un récipient à bouchon à vis au réfrigérateur entre 2 et 10°C.

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 brillante sur le kinétoplaste 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 la plage de 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 présente pas de fluorescence spécifique du kinétoplaste sur le substrat *Crithidia luciliae* d'Immuno Concepts.

Réactif immunofluorescent: Réf. catalogue 3009G (9,0 ml), 3075G (23 ml). Globuline de chèvre anti-IgG humaine (spécifique à la chaîne gamma) couplée à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Les kits de test complets comprennent des flacons compte-gouttes de précision prêt à l'emploi. Chaque flacon contient 9,0 ml de réactif, soit la quantité suffisante pour 10 lames.

COMPOSANTS NON RÉACTIFS
Poudre tampon PBS: Réf. catalogue 1011. Solution saline en poudre tamponnée au phosphate (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: Référence catalogue 1042. Chaque paquet contient 10 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
Jarres Coplin ou cuves à coloration
Pissette en plastique ou pipettes Pasteur
Pipettes sérologiques
Eau désionisée ou distillée
Tubes à essai pour préparer les dilutions de sérum
Papier absorbant ou serviettes en papier

Gants jetables
Récipients à bouchon à vis d'un litre (pour tampon PBS)
Chronomètre de laboratoire
Microscope à fluorescence équipé d'un filtre d'excitation de 495 nm et d'un filtre d'émission de 515 nm
Boîte de Pétri ou autre chambre pour incubation

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 kit 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 optimums. 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 procedure technique.
15. La contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
16. Ne pas 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.

Prélèvement D'échantillions

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.

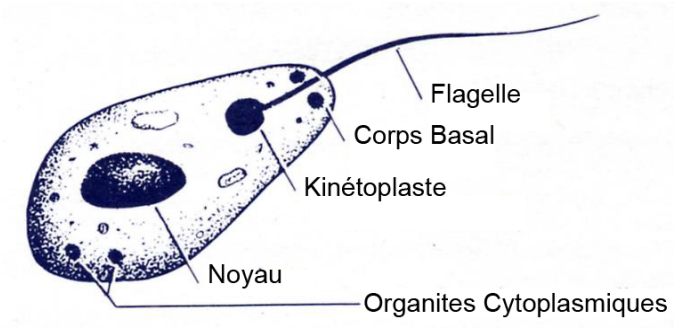
Substances interférentes: Les sérums présentant un degré élevé d'hémolyse, d'ictère, de lipémie ou de prolifération microbienne doivent être écartés car ces anomalies peuvent engendrer des résultats aberrants. Les échantillons contenant des particules visibles doivent être clarifiés par centrifugation 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 vert pomme intense dans le 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 présenter aucune fluorescence verte. 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 du titrage.

Le titre moyen et la plage de titrage (± une 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 anti-ADN natif. 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 fluorescent IgG anti-ADN natif 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 (± 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. Type de source lumineuse utilisé. Les sources de lumière au mercure génèreront une plus grande énergie d'excitation à 495 nm que le quartz/l'halogène. Les sources de lumière au mercure 50 watts, 100 watts et 200 watts diffèrent peu en matière d'énergie d'excitation à 495 nm. Les sources de lumière au quartz/à l'halogène 100 watts produiront une plus grande énergie d'excitation à 495 nm que le quartz/l'halogène 50 watts.
2. État et âge de la source lumineuse. Cela est particulièrement vrai pour les sources de lumière au mercure qui affichent généralement une réduction progressive de l'énergie d'excitation à 495 nm avant de griller. Cette réduction progressive peut entraîner une perte de sensibilité significative au fil des semaines. Ce problème peut être résolu par la tenue d'un journal. Pour de meilleurs résultats, remplacer les ampoules au mercure de 50 watts toutes les 100 heures et les ampoules au mercure de 100 ou 200 watts toutes les 200 heures. Les sources de lumière au quartz/halogène n'affichent généralement pas de réduction progressive de l'énergie d'excitation avant de griller.
3. Type de filtre d'excitation utilisé. Les filtres d'excitation interférentiels offrent une plus grande sensibilité sur une longueur d'onde beaucoup plus étroite que les filtres d'excitation absorbants. Se reporter au manuel du microscope à fluorescence ou contacter le représentant pour plus d'informations.
4. Alignement correct de l'axe optique du microscope. Pour les instructions, se reporter au manuel du microscope à fluorescence.
5. Ouverture numérique de l'objectif. Grâce à la lumière incidente (Epi), la fluorescence augmente de manière exponentielle à mesure que l'ouverture numérique (ON) de l'objectif augmente. Cela peut conduire un objectif 40X avec une ON de 0,65 à lire une ou plusieurs dilutions inférieures à un objectif 40X avec une ON de 0,85. L'ouverture numérique est indiquée sur le côté de l'objectif.
6. Filtres de suppression. Les filtres de suppression réduisent les longueurs d'onde d'excitation spécifiques et peuvent être utilisés pour réduire la sensibilité. Se reporter au manuel du microscope à fluorescence ou contacter le représentant pour plus d'informations.
7. 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 est visible est le résultat du titrage. Nous recommandons cette technique pour la détermination des résultats du titrage.

Intensité de la Fluorescence

L'intensité fluorescente peut être semi-quantifiée à l'aide des directives établies par le Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta (Georgie) pour les réactifs immunofluorescents.

4+ Jaune-vert intense (fluorescence maximale)
3+ Fluorescence jaune-vert moins intense
2+ Image cellulaire nette mais faible fluorescence
1+ Fluorescence très voilée

Une lame standard pour la détermination de ces intensités fluorescentes, FITC QC Slide™, référence catalogue 1900, est disponible auprès d'Immuno Concepts N.A., Ltd.

Communication des Résultats

Test: Les résultats doivent être notés 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 (1) ou, en cas de LED précédemment diagnostiqué, une maladie récurrente ou une absence de réaction au traitement (2-4).

Noyau: Fluorescence lisse, périphérique ou mouchetée du noyau.

Résultat: Négatif aux anticorps anti-ADNn.
Antigènes: Antigènes associés au noyau (2-4).
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 les patients souffrant de LED ne présentant pas de fluorescence du kinétoplaste ou du noyau (18).

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 inconus.
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 (19-20).
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 sclérodermie généralisée évolutive, de dermatomyosite, de lupus érythémateux discoïde et de connectivité mixte (2).
5. En raison des nombreuses options disponibles sur les microscopes à fluorescence, il est recommandé que les sources de lumière, les filtres et les optiques soient normalisés lors de la comparaison des titres de patients entre plusieurs laboratoires.
6. Les patients sous traitement stéroïdien peuvent présenter des résultats négatifs aux anticorps anti-ADN natif (21).

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 (19-20).

Performances

Le système de test fluorescent IgG anti-ADN natif d'Immuno Concepts a été comparé à un autre système du même type disponible sur le marché. La population étudiée comprenait 121 échantillons soumis à des laboratoires

cliniques pour le test anti-ADN natif, 100 donneurs de sang et 2 témoins de l'OMS dont la teneur en anticorps anti-ADN natif était connue. Tous les échantillons ont été testés en parallèle, sur le dispositif équivalent et sur le dispositif étudié. Cette comparaison a permis d'obtenir les données suivantes:

		Équivalent IgG anti-nDNA Test	
		Positif	Negatif
Immuno Concepts IgG anti-nDNA	Positif	28	0
	Negatif	2	193

Ces données permettent d'établir les statistiques suivantes : sensibilité relative, 93,3%; spécificité relative, 100%; valeur prévisionnelle positive, 100%; valeur prévisionnelle négative, 99,0% et agrément total, 99,1%.

L'un des deux échantillons « faussement négatifs » était négatif aux anticorps anti-nucléaires par immunofluorescence indirecte à l'aide de cellules HEp-2 et n'aurait pas satisfait aux critères d'analyse pour le test anti-ADN natif dans la plupart des laboratoires cliniques.

REPRODUCTIBILITE DU TITRE

Afin de déterminer la reproductibilité intra-dosage, un seul sérum positif à l'anti-ADN natif a été testé sur 30 réplicats par un même technicien lors d'une analyse unique. Les valeurs médianes et de mode pour ces données étaient de 1:160, avec un coefficient de variabilité géométrique de 0,78%. La variabilité inter-dosage a été déterminée par examen des valeurs de titre pour un seul sérum positif à l'anti-ADN natif analysé dans quinze lots de kits différents. Les valeurs médianes et de mode pour ces données étaient aussi de 1:160, avec un coefficient géométrique de variation de 0,82%. Dans les tests inter-dosage et intra-dosage, toutes les valeurs de titre étaient comprises dans une plage à plus ou moins une dilution près de la médiane.

Bibliographie

1. 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.
2. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann. Int. Med. 83:464-469, 1975.
3. 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.
4. 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.
5. Wold, R. T., Young, F. E., Tan, E. M., et al. Deoxyribonucleic Acid Antibody: A Method to Detect its Primary Interaction With Deoxyribonucleic Acid. Science 161:806-807, 1968.
6. Ginsberg, B., Keiser, H. A Millipore Filter Assay for Antibodies to Native DNA in Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 16:199-207, 1973.
7. Schur, P. H., DeAngelis, D., Jackson, J. M. Immunological Detection of Nucleic Acids and Antibodies to Nucleic Acids and Nuclear Antigens by Counterimmunoelectrophoresis. Clin. Exp. Immunol. 17:209-218, 1974.
8. Crowe, W., Kushner, I. An Immunofluorescent Method using *Crithidia luciliae* to Detect Antibodies to Double Stranded DNA. Arth. Rheum. 20:811-814, 1977.
9. 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.
10. Simpson, L. Behavior of the Kinetoplast of *Leishmania tarentolae* Upon Cell Rupture. J. Protozool. 15:132-136, 1968.
11. 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.
12. 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.
13. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A. Current Status of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA) in Systemic Rheumatic Diseases. I: 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Weller, T. H., Coons, A. H. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86:789-794, 1954.
18. 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.
19. Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. J. Rheum. 2:215-220, 1975.
20. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. J. Rheum. 2:167-171, 1975.
21. Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia luciliae* Method. Arthritis Rheum. 22:321-328, 1979.

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

	Constructeur	EC REP	Représentant autorisé dans le Communauté européen
	Limitation de la Température	Σ	Contient suffisamment pour <n> essais
	Consultez les instructions pour l'usage	IVD	Dispositif Médical Diagnostique In vitro
EC REP	MDSS GmbH Schiffgraben 41 D-30175 Hannover, Germany	CE	

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 3000G-I, 4.11.02.003.095-Fr Rev 2.0 © Copyright 2011

Procédure de Test Fluorescent IgG anti-ADN natif

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. **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.
Titrage semi-quantitatif: 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.

3. **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.

4. **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'EMBOUT DU COMPTE-GOUTTES AVEC LA SURFACE DE LA LAME PEUT ALTÉRER LE SUBSTRAT ANTIGÉNIQUE.

5. **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).

6. **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 du 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.

7. **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.

8. **RÉACTIF IMMUNOFLUORESCENT** (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 immunofluorescent. Commencer par placer une goutte sur chaque puits. Recommencer l'opération pour chaque lame. Le réactif immunofluorescent 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 IMMUNOFLUORESCENT PENDANT PLUS DE 15 SECONDES.

9. **INCUBATION DES LAMES** (30 minutes ± 5 minutes à température ambiante, soit 18-24°C)
Placer le couvercle sur la chambre d'incubation puis, si la chambre n'est pas opaque, la couvrir d'une serviette en papier pour l'abriter de la lumière. Laisser la ou les lames incuber pendant 30 minutes (± 5 minutes) à température ambiante (18-24°C).

10. **RINÇAGE EN TAMPON PBS**
Sortir les lames du plateau d'incubation et les rincer rapidement avec du PBS. Ne pas asperger le tampon directement sur les puits.

11. **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.

12. **MONTAGE DE LA LAMELLE COUVRE-OBJET**
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.
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 une forte fluorescence de fond en raison de l'accumulation de lumière ou être à l'origine d'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.

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

immuno concepts®