









# Anti-dsDNA MODE D'EMPLOI

96 déterminations

**REF** 4015



Test immunoenzymatique (ELISA) pour le dosage des auto-anticorps IgG anti-ADN double brin dans le sérum ou le plasma humain.

<b>REF</b>	N° de catalogue	<b>LOT</b>	N° de lot
	Se référer aux documents		Fabriqué par
	A stocker à		Date de péremption
	Consulter le mode d'emploi		Risque biologique

## INTRODUCTION

La trousse anti-dsDNA est destinée au dosage quantitatif des anticorps IgG anti-ADN double brin dans le sérum ou le plasma humain pour le diagnostic du lupus érythémateux disséminé (LED).

Les maladies auto-immunes systémiques telles que le LED sont associées à l'apparition d'un grand nombre d'auto-anticorps dirigés contre des composants cellulaires du noyau ou du cytoplasme. Bien que la signification et le rôle pathologique de certains de ces auto-anticorps restent mal connus, la mise en évidence des auto-anticorps joue un rôle important dans le diagnostic de ces maladies.

D'étiologie inconnue, le LED appartient à la famille des connectivites, c'est-à-dire qui touche plusieurs organes. Cette affection touche préférentiellement la femme jeune entre 20 et 40 ans.

Les anticorps contre l'ADN natif constituent l'un des meilleurs marqueurs biologiques du LED et figure dans les critères de classification de l'ACR (American College of Rheumatology) (1,2).

Generic Assays a mis au point une gamme complète de marqueurs sérologiques pour les maladies auto-immunes systémiques. Tous ces dosages sont basés sur le même protocole et la même dilution des échantillons.

(1) Tan EM: Antibodies to nuclear antigens (ANA) and their immunobiology and medicine. Adv Immunol 1982 33:167-240

(2) Tan EM, Cohen AS, Fries JF et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982 25:1271-7

## PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse anti-ADN double brin est un dosage immuno-enzymatique pour la détermination quantitative des IgG contre l'ADN natif.

Les anticorps présents dans les calibrateurs, le contrôle et les échantillons dilués réagissent avec de l'ADN double brin immobilisé sur des microcupules en polystyrène. L'utilisation de l'ADN double brin humain garantit la spécificité du dosage.

Au cours d'une première incubation de 60 minutes à température ambiante, les anticorps anti-ADN double brin, s'ils sont présents, se fixent spécifiquement aux cupules.

Après lavage, un anticorps anti-IgG humaines conjugué à la peroxydase de raifort se lie aux immunoglobulines précédemment retenues sur la phase solide.

Au terme d'une seconde incubation de 30 minutes à température ambiante, l'excès de conjugué est éliminé par lavage, puis la présence de l'enzyme est révélée par un substrat chromogène (TMB). La densité optique de l'échantillon est déterminée par lecture à 450 nm sur un lecteur de microplaques après addition d'une solution d'arrêt : la valeur obtenue est comparée à la densité optique fournie par des calibrateurs de concentrations connues en anticorps anti-ADN.

La trousse permet également une détermination semi-quantitative en utilisant la densité optique du calibrateur 2 comme valeur seuil.

## ECHANTILLONS DES PATIENTS

### **Prélèvement et conservation des échantillons**

Le sang est prélevé par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum est récupéré par centrifugation. Il peut être conservé à 2-8°C pour un maximum de 3 jours. Au-delà de cette durée, conserver à -20°C. Le plasma est également utilisable. Les échantillons lipémiques, hémolysés ou contaminés ne doivent pas être utilisés.

Eviter les congélations/décongélations répétées. Dans le cas d'utilisations multiples, aliquoter les échantillons et les stocker à -20 °C.

### Préparation avant utilisation

Mélanger soigneusement les échantillons de sérum pour obtenir une certaine homogénéité.

**Note :** Les échantillons doivent être dilués au 1/101 (v/v) avant de débiter le dosage, soit 10 µl d'échantillon + 1 ml de diluant (C).

## Composition du kit pour 96 déterminations

A <b>Ag 96</b>	<b>Microplaque 96 puits</b> : 12 barrettes sécables de 8 puits revêtus d'ADN double brin humain	1 plaque scellée sous vide avec dessiccateur
B <b>BUFWASH</b>	<b>Tampon de lavage concentré</b> pour 1000 ml de solution <b>10X</b>	1 flacon de 100 ml de solution concentrée, bouchon blanc
C <b>DIL</b>	<b>Diluant des échantillons</b>	1 flacon de 100 ml prêt à l'emploi, bouchon noir
D <b>CONJ</b>	<b>Conjugué</b> : solution d'anti-IgG humaine de mouton couplé à la peroxidase de raifort	1 flacon de 15 ml prêt à l'emploi, bouchon rouge
E <b>SOLN TMB</b>	<b>Substrat</b> : 3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine en tampon citrate avec de l'eau oxygénée	1 flacon de 15 ml prêt à l'emploi, bouchon bleu
F <b>H2SO4</b>	<b>Solution d'arrêt</b> : acide sulfurique 0,25M <b>0,25 M</b>	1 flacon de 15 ml prêt à l'emploi, bouchon jaune
P <b>CONTROL</b>	<b>Contrôle positif</b> : sérum humain dilué (concentrations : voir fiche jointe) <b>+</b>	1 flacon de 1,0 ml prêt à l'emploi
0 - 4 <b>CAL</b>	<b>Calibrateurs</b> : sérums humains dilués (concentration : 1, 10, 30, 100, 300 UI/ml)	5 flacons de 1,0 ml prêts à l'emploi

### Matériel non fourni

- micropipette 100 - 1000 µl
- micropipette 10 - 100 µl
- pipette multicanaux 50 – 200 µl et réservoir
- peigne de lavage à 8 canaux avec pompe à vide ou laveur de microplaques
- lecteur de microplaque avec filtres optiques 450 nm, 620 nm ou 690 nm
- eau distillée ou déionisée
- cylindre gradué

## **Format et conservation**

La trousse anti-ADN double brin a été conçue pour 96 déterminations.

La date de validité de chaque réactif est indiquée sur l'étiquette correspondante et rapportée sur l'étiquette du coffret.

A réception du coffret, tous les composants de la trousse doivent être conservés à 2 – 8 °C, de préférence dans l'emballage d'origine.

Après ouverture du coffret, tous les composants sont stables pour un minimum de 2 mois dans les conditions de conservation prescrites.

## **Préparation avant l'emploi**

Porter tous les composants du coffret à température du laboratoire avant utilisation pour le dosage.

La plaque de microtitration est scellée sous vide avec un dessicant. La plaque est composée d'un cadre et de barrettes de cupules sécables. Porter la plaque à température ambiante avant d'ouvrir son emballage. Les cupules inutilisées doivent être conservées à 2-8°C et replacées dans l'emballage d'origine pour les protéger de l'humidité.

Préparer une quantité suffisante de solution de lavage en diluant le tampon concentré 10x (1+9) avec de l'eau déionisée ou de l'eau distillée. La solution de lavage diluée est stable à 2-8°C pendant 30 jours. Veiller à ce que le temps de contact de la solution de lavage dans les cupules soit d'au moins 5 secondes par cycle de lavage.

Eviter d'exposer le substrat à la lumière.

## **PROTOCOLE DE DOSAGE**

- **Diluer les sérums des patients avec le diluant des échantillons (C) au 1/101 (v/v) ; exemple 10 µl + 1,0 ml de diluant des échantillons (C).**
  - **Une fois l'analyse commencée, toutes les étapes doivent être menées à leur terme sans interruption, en respectant les temps d'incubation prescrits.**
1. Porter tous les réactifs à température ambiante (20 à 25°C) et mélanger doucement en évitant la formation de mousse.
  2. Pipeter
    - 100 µl de calibrateur 0 (en option) et de calibrateurs 1 à 4
    - Ou 100 µl de calibrateur 2 (procédure semi-quantitative)
    - 100 µl de contrôle (P)
    - 100 µl des échantillons dilués des patients

3. Couvrir la plaque et incuber 60 minutes à température du laboratoire.
4. Décanter. Laver chaque cupule **3 fois** avec 300 µl de solution de lavage (préparée à partir de **B**).
5. Ajouter 100 µl de conjugué (**D**) à chaque cupule.
6. Couvrir la plaque et incuber 30 minutes à température ambiante.
7. Décanter. Laver chaque cupule **3 fois** avec 300 µl de solution de lavage (préparée à partir de **B**).
8. Ajouter 100 µl de substrat (**E**) à chaque cupule.
9. Incuber 15 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante.
10. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (**F**) à chaque cupule et mélanger doucement.
11. Lire les densités optiques à 450 nm dans les 15 minutes suivant l'étape 10.

## CALCUL DES RÉSULTATS

La trousse permet d'évaluer les résultats de manière quantitative (5 calibrateurs) ou semi-quantitative (calibreur 2).

Les logiciels des lecteurs de microplaque permettent habituellement les 2 modes de calcul.

### **Dosage semi-quantitatif**

Calculer l'indice de liaison IL en utilisant la densité optique du calibreur 2 (30 UI/ml) comme valeur seuil. L'indice de liaison est obtenu en divisant la densité optique de l'échantillon par la densité optique du calibreur 2.

$$\text{IL} = \text{DO échantillon} / \text{DO calibreur 2}$$

### **Dosage quantitatif**

Calculer la moyenne des DO pour chaque paire de cupules (calibrateurs, contrôle et échantillons).

Construire sur du papier semi-logarithmique une courbe d'étalonnage en portant en ordonnée les DO des calibrateurs et leurs concentrations en abscisse.

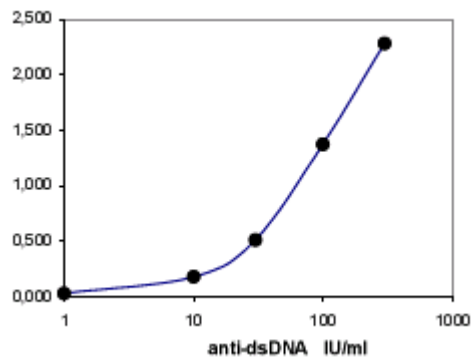
En fonction de la DO de chaque échantillon, lire directement la concentration **sans appliquer de facteur de dilution**.

En cas de traitement des données par ordinateur, utiliser un logiciel capable de calculer les courbes log/lin avec un modèle à 4 paramètres.

## Exemple de résultats

**A ne pas utiliser lors des tests !**

Puits	DO1	DO2	DO Moyenne	UI/ml
Calibrateur 0	0,028	0,029	0,029	<b>1</b>
Calibrateur 1	0,175	0,184	0,180	<b>10</b>
Calibrateur 2	0,504	0,518	0,511	<b>30</b>
Calibrateur 3	1,350	1,394	1,372	<b>100</b>
Calibrateur 4	2,271	2,289	2,280	<b>300</b>
Patient 1	1,179	1,159	1,169	<b>75</b>



Les échantillons dont la densité optique est supérieure à celle du calibrateur 4 doivent être dilués avec un sérum négatif en anti-ADN et redosés. Les résultats obtenus seront multipliés par le facteur de dilution approprié.

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Afin de valider la manipulation, le calibrateur 1 doit impérativement avoir une densité optique moyenne inférieure ou égale à 0,5. Le calibrateur 4 doit impérativement avoir une densité optique moyenne supérieure ou égale à 1,2.

Si ces critères ne sont pas remplis, répéter le dosage en vérifiant que toutes les étapes de la procédure ont été scrupuleusement respectées (temps et températures d'incubation, dilution du tampon de lavage, étapes de lavage...). En cas de nouvel échec, contacter votre fournisseur.

## VALEURS DE REFERENCE

Anti-ADN double brin	UI/ml	IL
Positif	>35	> 1,2
Négatif	<30	< 1,0
Zone grise	30 - 35	1,0 – 1,2

Les échantillons dont les concentrations se situent dans la zone grise doivent être redosés. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs normales et pathologiques. De ce fait, les valeurs ci-dessus sont données uniquement à titre indicatif.

### Limites du test

Les patients sains doivent être négatifs en utilisant le coffret anti-ADN double brin. Toutefois, on peut observer un résultat positif chez certaines personnes apparemment saines ainsi que chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, de syndrome de Gougerot-Sjögren ou d'hépatite auto-immune.

Tout diagnostic ne doit pas être basé sur le seul résultat de la biologie, le médecin devant prendre en compte l'ensemble des aspects cliniques et biologiques.

## DONNEES ANALYTIQUES

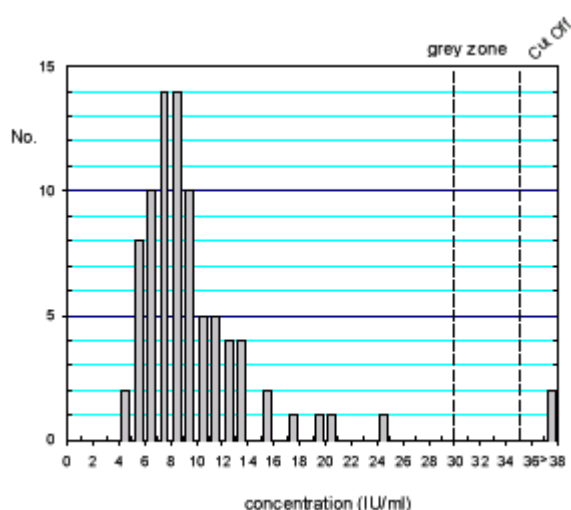
### Calibration

La trousse est calibrée contre la préparation internationale de référence W1065 (Wo/80) du CLB (Laboratoire central de la croix rouge néerlandaise à Amsterdam).

### Sensibilité et spécificité cliniques

Une étude comparative avec une autre trousse ELISA portant sur 44 individus atteints de LED a fourni une sensibilité supérieure à 95%.

Une autre étude portant sur 44 donneurs sang a fourni une spécificité de 98%.



## Précision

### Répétabilité

4 sérums ont été mesurés en 8 réplicats dans un seul dosage

Echantillon n°	UI/ml	CV (%)
1	180	3,3
2	92	3,9
3	67	4,5
4	41	2,4

### Reproductibilité

4 sérums ont été mesurés en triplicats dans 8 dosages distincts



Echantillon n°	UI/ml	CV (%)
1	157	7,6
2	130	8,4
3	92	5,0
4	41	8,6

## PROTOCOLE RESUME

Diluer les échantillons des patients: 10 µl + 1,0 ml de diluant des échantillons (C)

1	Amener tous les réactifs à température ambiante (20 à 25°C)		
		Contrôles	Patient 1 etc.
2	Pipeter Calibrateurs 0 - 4 Ou Calibrateur 2 Contrôle positif (P) Sérum dilué Patient 1 etc.	100 µl	100 µl
3	Incuber	60 minutes à température ambiante 18-25°C	
4	Laver et décanner	3 x 300 µl (à partir de B)	
5	Pipeter le conjugué (D)	100 µl	100 µl
6	Incuber	30 minutes à température ambiante 18-25°C	
7	Laver et décanner	3 x 300 µl (à partir de B)	
8	Pipeter le substrat (E)	100 µl	100 µl
9	Incuber à l'abri de la lumière	15 minutes à température ambiante 18-25°C	
10	Pipeter la solution d'arrêt (F)	100 µl	100 µl
11	Mesurer la DO à 450 nm dans les 30 minutes		

## PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Ce coffret est destiné uniquement à un usage *in vitro*. Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
- Les dates d'expiration sur les différentes étiquettes doivent être respectées, ainsi que les délais de conservation des réactifs après reconstitution.
- Ne pas utiliser ou mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser des réactifs d'autres fabricants.
- Eviter les temps morts durant la distribution des réactifs.
- Tous les réactifs doivent être stockés à 2 – 8 °C dans l'emballage d'origine avant toute utilisation.
- Eviter tout contact de l'acide sulfurique (solution d'arrêt) avec la peau et les muqueuses. En cas d'éclaboussures, laver immédiatement à l'eau.
-  • Certains des réactifs contiennent de faibles quantités de thimérosal (< 0,1%) et de kathon (1% v/v). Ils ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses.
-  • Les produits d'origine humaine ont subi un dépistage négatif vis-à-vis des anticorps anti-VIH, anti-VHC et de l'antigène HBS. Toutefois, aucun test de laboratoire ne peut garantir l'absence de ces agents viraux. Les réactifs comme les échantillons doivent donc être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.

Distribution en France :

**LABODIA**

LABODIA France  
266 avenue Daumesnil  
75012 PARIS

 N° Vert 0800 114 700

Fax : 03.21.49.59.56

E-mail : [info@labodia.com](mailto:info@labodia.com)

Website : [www.labodia.com](http://www.labodia.com)