

Mode d'emploi Lupus Dot (#4081)

24 x 4 déterminations







(Rév. 26/10/2007)



IVD

Utilisation pour le diagnostic in vitro

Immunodot pour la détection des anticorps IgG anti-Sm, anti-nucléosomes, anti-histones et anti-ribosomes dans le sérum ou le plasma humain

REF	N° de catalogue	LOT	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 Lupus Dot est destinée à la détermination qualitative des anticorps IgG anti-Sm, anti-nucléosomes, anti-histones et anti-ribosomes dans le sérum ou le plasma humain en vue du diagnostic différentiel du Lupus érythémateux disséminé (LED).

Le LED est une maladie auto-immune caractérisée par l'apparition de nombreux auto-anticorps dirigés contre des antigènes de la chromatine tels que les anti-ADN natif et les anti-histones. En outre, les anti-Sm et les anti-ribosomes sont pathognomoniques du LED.

Les anticorps anti-nucléosomes constituent des marqueurs précoces et spécifiques du LED et sont dirigés contre des épitopes conformationnels communs aux nucléosomes natifs. Au cours de l'évolution de la maladie, la réponse auto-immune peut se diversifier et englober des composants des nucléosomes, l'ADN et les histones.

En outre, les complexes nucléosomes - anti-nucléosomes, en se déposant dans la membrane basale glomérulaire, jouent un rôle pathogène majeur dans les néphrites lupiques. Les anti-nucléosomes semblent donc des marqueurs plus spécifiques et plus précoces de la néphrite lupique que les anti-ADN natif.

Les anticorps anti-Sm reconnaissent principalement de petites ribonucléoprotéines nucléaires. Le terme de Sm dérive de Smith, nom de famille du premier patient chez qui ces anticorps ont été observés. Les anti-Sm avec les anti-ADN natif sont parmi les marqueurs sérologiques les plus spécifiques du LED et figurent parmi les critères de diagnostic de l'ACR (American College of Rheumatology).

Chez 20% des lupiques, on détecte, outre des anticorps nucléaires, des auto-anticorps dirigés contre les phosphoprotéines ribosomales. Les anti-ribosomes sont bien corrélés avec l'évolution de la maladie et peuvent être utilisés pour le suivi de ces patients.

La trousse Lupus Dot permet la détection des 4 principales cibles antigéniques du Lupus : les nucléosomes, les histones, les ribosomes et les antigènes Sm. Elle constitue donc l'outil diagnostique le plus spécifique pour le diagnostic différentiel du LED et de ses variantes.

MADAIO MP, HODDER S, SCHWARTZ RS et al.: Responsiveness of autoimmune and normal mice to nucleic acid antigens. J Immunol 132 1984, 872-882

BURLINGAME, RW, RUBIN RL, BALDERAS RS, THEOFILOPOULOS AN: Genesis and evolution of antichromatin autoantibodies in murine lupus

indicates T-dependent immunization with self antigen. J Clin Invest 91 1993, 1687-1696

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

Lupus Dot est un immunodot sensible pour la mise en évidence d'anticorps de classe IgG contre les nucléosomes, les histones, les ribosomes et les protéines Sm dans le sérum ou le plasma humain. La trousse contient 24 bandelettes numérotées, chaque bandelette comportant 6 spots fixés sur un support plastique. 2 spots servent de contrôles positif et négatif.

Lors de la première incubation, les auto-anticorps présents dans les échantillons se lient aux antigènes cibles immobilisés sur les spots. Au terme de 30 minutes d'incubation à température ambiante sous agitation, les composants de l'échantillon qui ne se sont pas liés à la bandelette sont éliminés par lavage. Dans une seconde incubation de 30 minutes, les anticorps du patient réagissent avec un conjugué anti-IgG marqué à la phosphatase alcaline. L'excès de conjugué est éliminé par lavage.

La phosphatase alcaline convertit le substrat incolore en un précipité violet foncé. Après 10-12 minutes sous agitation, la réaction est arrêtée par une dernière étape de lavage.

Les bandelettes sont séchées pendant au moins 30 minutes en pressant le côté réactionnel sur du papier absorbant. Un résultat est considéré comme positif si la coloration du spot est plus intense que la coloration du contrôle négatif.

Préparation des échantillons

Collecte et récolte des échantillons

Prélever le sang par ponction veineuse. Récolter le sérum par centrifugation après coagulation. Le plasma peut également être utilisé dans ce test.

Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2 et +8°C pendant 3 jours maximum, sinon congelés à -20°C.

Eviter les cycles congélation/décongélation.

Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être dosés à température ambiante. Les mélanger par inversion avant le dosage.

Réactifs fournis

A Ag	Bandelettes : 24 bandelettes numérotées avec 6 spots : - contrôle positif - contrôle négatif - nucléosomes (bovin) - histones (H1,H2a, H2b, H3-H4 ; bovin) - Sm (protéine de 16 kDa, bovin) - ribosomes (P0, humain recombinant)	24 bandelettes
B BUFWASH	Tampon de lavage concentré pour 400 ml de solution 10X	1 flacon de 40 ml de solution concentrée, bouchon bleu
C DIL	Diluant des échantillons (coloré en jaune)	1 flacon de 40 ml prêt à l'emploi, bouchon jaune
D CONJ	Conjugué : solution d'anti-IgG humaine de chèvre couplé à la phosphatase alcaline (coloré en rouge)	1 flacon de 40 ml prêt à l'emploi, bouchon rouge
E SOLN NBT/BCIP	Substrat : nitro-bleu de tétrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	1 flacon de 40 ml prêt à l'emploi, bouchon noir
F	Plateau d'incubation à 8 canaux	3 plateaux

Matériel supplémentaire

- micropipette 100-1000µl
- micropipette 10-100µl
- pointes
- **agitateur à balancier ou rotatif**
- cylindres gradués
- eau distillée et eau déminéralisée
- pincettes en plastique
- papier absorbant

Stockage

Cette trousse permet l'analyse de 24 échantillons. La date d'expiration de chaque composant de la trousse figure sur son étiquette et la date d'expiration de la trousse sur l'étiquette du coffret. Dès réception, conserver tous les composants de la trousse à 2- 8°C, de préférence dans leur emballage d'origine. Après ouverture de la trousse, tous les composants sont stables au minimum 2 mois.

Préparation du dosage

Amener tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.

Diluer 1/10 le tampon (réactif B) avec de l'eau distillée ou déminéralisée.

Pour chaque bandelette à tester, il faut 15 ml de tampon dilué.
Exemple : 10 ml de tampon concentré + 90 ml d'eau distillée.

Après dilution, le tampon est stable à 2- 8°C pendant 1 mois. Tous les autres composants sont prêts à l'emploi et stables jusqu'à la date d'expiration.

Eviter d'exposer le substrat à la lumière.

Mode opératoire

- **Respecter strictement les instructions et éviter tout décalage dans les temps d'incubation**
 - **Tout le dosage doit se dérouler sur un agitateur à balancier**
- 1- Sortir les réactifs de la trousse et prélever le nombre requis de bandelettes. Mélanger les réactifs par inversion.
 - 2- Pipeter **2 ml** de tampon dilué (préparé à partir du tampon B) dans chaque canal du plateau. Puis, à l'aide de la pincette, placer chaque bandelette dans le canal, **côté réactionnel tourné vers le haut. Il est important de mettre le tampon avant la bandelette, et ensuite de vérifier que celle-ci est bien immergée. Éviter la formation de bulles d'air à la surface de la bandelette côté réactionnel.**
 - 3- Couvrir et incuber 10 minutes à température ambiante 18-25°C sous agitation.
 - 4- Décanter (Attention : Laisser écouler le liquide d'incubation en inclinant le plateau d'incubation. Eliminer le liquide restant avec du papier absorbant).
 - 5- Ajouter 1,5 ml de diluant des échantillons (C) et 10 µl d'échantillon de patients.
 - 6- Couvrir et incuber 30 minutes à température ambiante 18-25°C sous agitation.
 - 7- Décanter (Attention : Laisser écouler le liquide d'incubation en inclinant le plateau d'incubation. Eliminer le liquide restant avec du papier absorbant). Distribuer **1,5 ml de tampon dilué**. Incuber **3 minutes sous agitation**. Décanter et répéter l'opération 2 fois 3 minutes sous agitation pour un total de **3 lavages**.
 - 8- Pipeter **1,5 ml** de conjugué (D) à **température ambiante** dans chaque canal
 - 9- Couvrir et incuber 30 minutes à température ambiante (18-25°C) sous agitation
 - 10- Décanter (Attention : Laisser écouler le liquide d'incubation en inclinant le plateau d'incubation. Eliminer le liquide restant avec du papier absorbant). Distribuer **1,5 ml de tampon dilué**. Incuber **3 minutes sous agitation**. Décanter et répéter l'opération 2 fois 3 minutes sous agitation pour un total de **3 lavages**.
 - 11- Pipeter **1,5 ml** de substrat (E) à **température ambiante** dans chaque canal
 - 12- Couvrir et incuber 10 - 12 minutes à température ambiante (18-25°C) sous agitation
 - 13- Décanter et laver 1 fois avec 1,5 ml de tampon dilué (à partir de B) à **TEMPERATURE AMBIANTE** pour stopper la réaction du substrat. (Attention : Laisser écouler le liquide d'incubation en inclinant le plateau d'incubation. Eliminer le liquide restant avec du papier absorbant).
 - 14- Saisir les bandelettes par leur extrémité numérotée à l'aide d'une pincette et les déposer sur du papier absorbant face réactionnelle contre le papier. Les presser brièvement. Au bout de 30 minutes, procéder à la lecture.

Lecture des résultats

Les bandelettes ne peuvent être interprétées qu'après séchage complet pendant au moins 30 minutes.

Le **contrôle positif** doit être visible sur chaque bandelette. Sa coloration garantit que le test a été effectué correctement et que les réactifs n'ont subi aucune dégradation. Si le spot du contrôle positif n'est pas coloré, les résultats ne peuvent pas être interprétés.

Le **contrôle négatif** reflète l'intensité du bruit de fond de l'échantillon. La coloration de ce spot correspond à l'intensité minimale au-delà de laquelle un échantillon est considéré comme positif.

Les spots revêtus d'auto-antigènes détectent la présence d'auto-anticorps spécifiques dans les échantillons. L'intensité de ces spots dépend du titre d'auto-anticorps contenu dans l'échantillon. Un échantillon est considéré comme positif pour 1 type d'auto-anticorps si la coloration du spot correspondant est plus intense que le contrôle négatif.

1	Lupus Dot	Résultat :
●	- positive control	Positif
○	- nucleosomes	
○	- histones	
●	- Sm	Positif
○	- ribosomes	
●	- negative control	

Résultat positif

Un échantillon est considéré comme positif pour la présence d'auto-anticorps contre les nucléosomes, les histones, la protéine Sm ou les ribosomes si la coloration de ces spots est plus intense que la coloration du contrôle négatif.

A noter que l'intensité de la coloration du contrôle négatif dépend des conditions expérimentales (temps et température d'incubation, efficacité des lavages) et de la composition de chaque échantillon. Ce spot peut être totalement incolore alors que le test a été effectué dans de bonnes conditions.

Résultat négatif

Un échantillon est considéré comme négatif pour la présence d'auto-anticorps contre les nucléosomes, les histones, la protéine Sm ou les ribosomes si la coloration de ces spots est moins intense que la coloration du contrôle négatif.

Limites d'utilisation

Les individus sains devraient fournir des résultats négatifs dans ce test. Toutefois, on peut rencontrer des anti-nucléosomes, anti-histones, anti-Sm ou anti-ribosomes chez des personnes apparemment saines. Les résultats de ce test doivent être interprétés par un médecin en tenant compte de l'ensemble du tableau clinique et biologique.

Données analytiques

Spécificité et sensibilité cliniques

La sensibilité du test a été évaluée en testant des populations cliniquement et biologiquement définies (en utilisant des tests biologiques de référence) : La spécificité a été évaluée en testant des groupes de contrôle cliniquement définis (population normale) et groupes de patients atteints de diverses pathologies auto-immunes.

Sensibilité :

Nucléosomes : 67%

Histones, Sm et ribosomes : > 99%

Spécificité :

Nucléosomes : 98%



Histones, Sm et ribosomes : > 99%

Protocole résumé

1	Amener tous les réactifs et le nombre requis de bandelettes à température ambiante (18-25 °C).
2	Placer les bandelettes avec le côté réactionnel en haut et distribuer 2 ml de solution de lavage (préparée à partir de B) dans chaque canal.
3	Sceller le plateau et incuber sous agitation 10 minutes à température ambiante (18-25 °C).
4	Éliminer la solution de lavage.
5	Pipeter 1,5 ml de diluant des échantillons (C) et 10 µl de sérum ou de plasma de patient (1+150) dans chaque canal.
6	Incuber sous agitation 30 minutes à température ambiante (18-25 °C).
7	Décantier et laver les bandelettes sous agitation 3 x 3 minutes avec 1,5 ml de tampon préparé à partir de B.
8	Pipeter 1,5 ml de conjugué (D) dans chaque canal.
9	Incuber sous agitation 30 minutes à température ambiante (18-25 °C).
10	Décantier et laver les bandelettes sous agitation 3 x 3 minutes avec 1,5 ml de tampon préparé à partir de B.
11	Pipeter 1,5 ml de substrat (E) dans chaque canal.
12	Couvrir le plateau et incuber sous agitation 10 à 12 minutes à température ambiante (18-25 °C).
13	Décantier et laver les bandelettes 3 minutes sous agitation avec 1,5 ml de tampon préparé à partir de B.
14	Décantier et sécher les bandelettes en les pressant sur du papier absorbant. Lire les résultats après 30 minutes.

Précautions 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 sont à suivre.

- 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.
-  • Certains des réactifs contiennent de faibles quantités de bromonitrodioxane (<0,01% v/v), de méthylisothiazolone (<20ppm) ou d'azoture de sodium (<0,05% p/v) en tant qu'agent conservateurs. Ils ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses.
-  • Comme la trousse contient certaines substances présentant un risque biologique, observer les précautions suivantes :
 - Ne pas fumer, manger ou boire lors de la manipulation des réactifs.
 - Toujours utiliser des gants de protection.
 - Ne jamais pipeter avec la bouche.
 - Nettoyer rapidement les réactifs renversés et bien laver la surface avec un décontaminant.

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
Website : www.labodia.com