

REF

**708200, 708205,
508200.10, 508205.20, 508205.80**

Rx Only

Application

NOVA Lite dsDNA *Crithidia luciliae* est un test par immunofluorescence indirecte pour la détection et la détermination semi-quantitative de l'anti-ADN double brin (dsDNA) dans le sérum humain. La présence d'anticorps anti-ADN double brin peut être utilisée conjointement avec d'autres tests sérologiques et résultats cliniques afin d'aider au diagnostic du lupus érythémateux disséminé (SLE).

Informations concernant le test

Le test NOVA Lite dsDNA *Crithidia luciliae* est un test de détection indirecte des anticorps immunofluorescents qui utilise comme substrat les *Crithidia luciliae*, hémoflagellées. Cet organisme à cellule unique possède une mitochondrie géante qui contient une masse fortement condensée d'ADN double brin circulaire.¹ Il semble que cette masse d'ADN double brin, connue sous le nom de kinétoplaste, soit exempte d'histones ou d'autres antigènes nucléaires mammaliens.^{1,2} Elle sert de substrat sensible et spécifique pour la détection d'autoanticorps anti-ADN double brin.

Les autoanticorps anti-ADN double brin sont présents de façon quasi exclusive chez les patients atteints du lupus érythémateux disséminé (SLE) et sont donc considérés comme des anticorps marqueurs. Les autoanticorps anti-ADN double brin ont été inclus dans les Critères de classification du Lupus Erythémateux Disséminé révisés en 1982 par un sous-comité de l'association de l'arthrite et du rhumatisme (Arthritis and Rheumatism Association).³

Alors que le test utilisé habituellement pour la détection des anticorps antinucléaires (ANA) est un test sensible pour la détection du SLE et d'autres maladies des tissus conjonctifs, il est loin d'être spécifique au SLE. Pour cette raison, tous les échantillons ANA positifs devraient être testés pour la détection spécifique d'anticorps anti-ADN double brin. La présence d'anticorps anti-ADN double brin indique fortement une présence de SLE ; toutefois, l'absence de ces anticorps n'exclut pas le SLE dans tous les cas.

Diverses méthodes ont été utilisées au fil des ans pour la détection des anticorps anti-ADN double brin. Ces méthodes comprennent entre autres la fixation du complément⁴, l'agglutination passive⁵ et le dosage radio-immunologique (RIA).⁶⁻⁸ L'avantage principal d'un test de détection de l'ADN double brin basé sur les *C. luciliae* est sa spécificité, en raison de la nature de la masse circulaire fortement spiralée d'ADN double brin dans le kinétoplaste.⁹⁻¹¹ Cette caractéristique est extrêmement importante pour un test de détection des anticorps marqueurs.

Principe du test

Dans la technique par immunofluorescence indirecte, les échantillons sont incubés avec l'antigène fixé sur la lame et les anticorps non liés sont éliminés au lavage. Le substrat est incubé avec un conjugué fluorescéine spécifique et le réactif non lié est ensuite éliminé au lavage. Lorsqu'ils sont vus à l'aide d'un microscope fluorescent, les échantillons ayant une réaction positive aux autoanticorps afficheront une fluorescence vert pomme qui correspond aux zones de la cellule ou des noyaux où l'autoanticorps s'est lié.

Contenu du coffret

1. dsDNA (*Crithidia luciliae*) Slide, 6 ou 12 puits/lame, avec dessiccateur

Les coffrets contiennent

1. Conjugué anti-IgG-FITC humain (chèvre) sans Evan's bleu, fluorescéine étiquetée dans le tampon contenant 0,09 % d'azide de sodium
2. dsDNA Positive 1 ampoule de solution tampon contenant 0,09 % d'azoture de sodium et des anticorps anti-ADN double brin de sérum prédilué
3. IFA System Negative Control, 1 flacon de solution tampon contenant 0,09 % d'azide de sodium et du sérum humain prédilué ne contenant aucun auto-anticorps anti-AND double brin
4. PBS II Concentrate (40x)
5. Mounting medium, 0,09 % d'azide de sodium
6. Coverslips

Avertissements

1. Tout le matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation des contrôles a été testé et trouvé négatif lors de la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-antigène de surface de l'Hépatite B et anti-Virus de l'Hépatite C à l'aide de tests approuvés par la FDA. Cependant, aucune méthode ne peut donner une garantie complète quant à l'absence de VIH, de VHB, du VHC ou d'autres agents infectieux. En conséquence, tous les sérums humains de contrôle doivent être manipulés avec les mêmes précautions que celles utilisées pour un matériel potentiellement infectieux.¹²
2. L'azide de sodium (NaN_3) est utilisé comme conservateur. NaN_3 est un poison et il est toxique en cas d'ingestion et de contact avec les yeux et la peau. Éviter de l'exposer aux bases, métaux ou autres composants, réagissant avec les acides. Après l'évacuation des réactifs, laver à grande eau afin d'éviter des dépôts dans les canalisations.
3. Lors de la manipulation de ces produits, utiliser les équipements de protection personnelle appropriés.

4. Les éclaboussures de réactifs doivent être nettoyées immédiatement. Respecter les règlements en vigueur concernant l'élimination des déchets.

Précautions

1. Ce test (coffret) est destiné à un usage diagnostique in vitro.
2. Toute substitution par d'autres réactifs que ceux fournis dans le coffret entraîne des variations de résultats.
3. Un lavage incomplet ou insuffisant du liquide dans les puits des lames entraînent des imprécisions et un bruit de fond élevé.
4. L'adaptation totale ou partielle de ce test aux automates de traitement d'échantillons ou de distribution de réactifs pourrait fournir des résultats différents de ceux obtenus par une méthode manuelle. Chaque laboratoire a la responsabilité de valider les limites raisonnables dans lesquels les résultats seront acceptés.
5. La variation des facteurs suivants influence la performance du test : la température des réactifs au démarrage du test, la puissance de la lampe du microscope, la précision et la reproductibilité du pipetage, le degré du lavage et la durée de l'incubation. Une grande attention est requise pour obtenir des résultats précis et reproductibles.
6. Il est recommandé de suivre strictement le protocole. Chaque modification est au risque de l'utilisateur.

Conditions de conservation

1. Conserver tous les réactifs du lames et coffret entre 2-8°C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes.
2. La solution de tampon diluée reste stable quatre semaines à 2-8°C.

Echantillons

Ce test doit être réalisé avec du sérum comme échantillon. L'addition d'azide ou d'autres conservateurs aux échantillons peut affecter le bon déroulement de la procédure. Les sérums contaminés par des agents microbiens, prétraités par la chaleur ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés. Les sérums ou échantillons hémolysés ou lipémiques sont à éviter.

Après prélèvement, le sérum doit être séparé du culot. Le document H18-A3 du NCCLS (CLSI) recommande les conditions suivantes de conservation: 1) Conserver les échantillons à température ambiante pas plus de 8 heures. 2) Si le test ne peut pas être fait dans les 8 heures, conserver les échantillons à 2-8°C. 3) Si le test ne s'effectue pas dans les 48 heures ou si on doit envoyer les échantillons, les congeler à -20°C ou à plus basse température. Bien agiter les échantillons décongelés.

Procédure, Matériel fourni (coffret)

708200

- 10 dsDNA (*Crithidia luciliae*) Slide (6 well)
- 1 4mL FITC IgG Conjugate
- 1 0,5 mL dsDNA Positive
- 1 0,5mL IFA System Negative Control
- 1 25mL PBS II Concentrate (40x)
- 1 7mL Mounting Medium
- 1 10 Coverslips

708205

- 20 dsDNA (*Crithidia luciliae*) Slide (12 well)
- 1 15mL FITC IgG Conjugate
- 1 0,5 mL dsDNA Positive
- 1 0,5mL IFA System Negative Control
- 2 25mL PBS II Concentrate (40x)
- 1 7mL Mounting Medium
- 1 20 Coverslips

Matériel fourni (Lames seules)

- 508200.10** 10 x dsDNA (*Crithidia luciliae*) Slide (6 well)
- 508205.20** 20 x dsDNA (*Crithidia luciliae*) Slide (12 well)
- 508205.80** 80 x dsDNA (*Crithidia luciliae*) Slide (12 well)

Autre matériel nécessaire non fourni

Micropipettes pouvant distribuer un volume de 15 à 1000 µl

Eau distillée ou déionisée

Pissettes ou pipettes Pasteur

Chambre humide

Récipient de 1 l (pour diluer le PBS II)

Bocal Coplin

Microscope à fluorescence avec excitatrice de 495 nm et filtre interférentiel de 515 nm

Méthode, Préparation du test

1. Amener tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26°C) et bien les mélanger avant de les utiliser.
2. **Diluer le concentré PBS II:** IMPORTANT : diluer le concentré PBS II 1:40 en ajoutant le contenu de la bouteille de concentré PBS II à 975 ml d'eau distillée ou déionisée et bien mélanger. Le tampon PBS II est utilisé pour diluer les échantillons des patients et comme tampon de lavage. Le tampon dilué peut être conservé jusqu'à 4 semaines à une température comprise entre 2 et 8° C.
3. **Diluer les échantillons des patients :**
 - a. Dépistage initial : diluer les échantillons des patients 1:10 avec la solution tampon PBS II diluée (c'est-à-dire, ajouter 100 µl de sérum à 900 µl de solution tampon PBS II).
 - b. Titration : diluer en série en double à partir de la dilution de dépistage initiale pour tous les échantillons positifs en utilisant la solution tampon PBS II (c'est-à-dire 1:20, 1:40, ... 1:640).

Exécution du test

1. **Préparation de la lame substrat :** laisser la lame atteindre la température ambiante avant de la retirer de sa pochette. Étiqueter la lame à l'aide d'un crayon et la placer dans une chambre humide adéquate. Ajouter une goutte (20 à 25 µl) du Contrôle positif non dilué et du Contrôle négatif respectivement sur les puits 1 et 2. Ajouter une goutte (20 à 25 µl) de l'échantillon du patient sur les puits restants.
2. **Incubation de la lame substrat :** incuber la lame pendant 30 ± 5 minutes dans une chambre humide (un essuie-tout humide placé à plat au fond d'un récipient de plastique ou de verre fermé permet de maintenir les conditions d'humidité appropriées). **Ne pas laisser le substrat se dessécher pendant la procédure d'analyse.**
3. **Lavage de la lame substrat :** après l'incubation, utiliser une pissette de plastique ou une pipette pour éliminer le sérum en rinçant délicatement avec la solution tampon PBS II diluée. Orienter la lame et le flot de solution tampon PBS II de façon à minimiser le débordement des échantillons entre les puits. **Ne pas diriger le flot directement dans les puits sous peine d'abîmer le substrat.** Si désiré, placez les lame dans une fiole de Coplin d'amortisseur dilué de PBS II pendant jusqu'à 5 minutes.
4. **Addition du conjugué fluorescent :** éliminer l'excès de la solution tampon PBS II en secouant la lame. Replacer la lame dans la chambre humide et recouvrir **immédiatement** chaque puits d'une goutte de conjugué fluorescent. Incuber la lame pendant 30 ± 5 minutes.
5. **Lavage de la lame substrat :** répéter l'étape 3.
6. **Montage de la lame substrat :** les procédures pour le montage d'une lame à l'aide de lamelles couvre-objet varient d'un laboratoire à un autre ; toutefois, la procédure suivante est recommandée :
 - a. Placer une lamelle couvre-objet sur un essuie-tout.
 - b. Appliquer le milieu de montage en une ligne continue sur le bord inférieur de la lamelle couvre-objet.
 - c. Éliminer l'excès de la solution tampon PBS II et placer le bord inférieur de la lame contre le bord de la lamelle couvre-objet. Abaisser avec précaution la lame sur la lamelle couvre-objet de façon à ce que le milieu de montage coule vers le bord supérieur de la lame sans former de bulles d'air.

Contrôle de qualité

Le ADN double brin positive et le contrôle négatif du système IFA devraient être testés sur chaque lame afin d'être certain que tous les réactifs et toutes les procédures ont été exécutées de façon appropriée. Un contrôle supplémentaire adéquat peut être préparé en utilisant des portions aliquotées d'échantillon de sérum humain provenant d'un groupe de personnes et en les conservant à $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Pour que les résultats des tests soient valides, tous les critères cités ci-dessous doivent être remplis. Si certains critères ne sont pas remplis, les résultats du test devraient être considérés comme invalides et l'analyse doit être répétée.

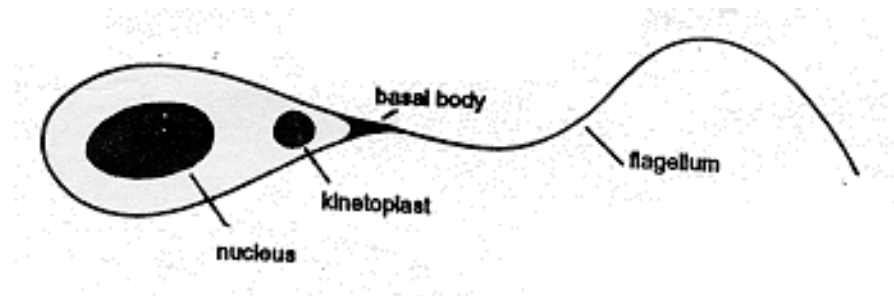
1. Le ADN double brin positive d'extrémité doit être $\geq 2+$.
2. Le contrôle négatif du système IFA doit être négatif.

Interprétation des résultats

Réaction négative. Un échantillon est considéré négatif si la coloration spécifique du kinétoplaste est moins forte que celle du contrôle négatif. La coloration d'autres structures telles que le corpuscule basal, le flagellum ou le noyau sans coloration concomitante du kinétoplaste devrait être considérée négative pour une réactivité à l'ADN double brin.

Réaction positive. Un échantillon est considéré positif si une coloration spécifique du kinétoplaste ou une coloration kinétoplaste et nucléaire est notée et est plus forte que celle du contrôle négatif. Tous les échantillons positifs devraient être titrés en utilisant des dilutions doubles en série jusqu'au point d'extrémité. Déterminer le grade ou l'intensité de la fluorescence à l'aide des critères suivants :

- 4+ Fluorescence éclatante vert pomme
- 3+ Fluorescence vive vert pomme
- 2+ Fluorescence positive bien visible
- 1+ Fluorescence spécifique la plus basse possible qui permettra à la coloration kinétoplaste d'être bien différenciée de la fluorescence de fond



Limites du test

- 1. L'utilisateur doit être conscient des effets produits par un excès d'anticorps et la possibilité d'obtenir des motifs de coloration non ADN double brin lors de la lecture des lames.
- 2. Une gamme de facteurs externes influencent la sensibilité du test y compris le type de microscope à fluorescence utilisé, la puissance et le nombre d'heures d'utilisation de l'ampoule, le grossissement utilisé, le système de filtration et l'observateur.
- 3. Si un filtre passe bande est utilisé au lieu d'un filtre interférentiel 515, on observera une coloration artéfactuelle accrue.
- 4. Utiliser uniquement un crayon pour étiqueter les lames. L'utilisation d'un instrument autre qu'un crayon risque de causer une coloration artéfactuelle.
- 5. Tous les bouchons Coplin utilisés pour laver les lames doivent être exempts de résidus de colorants. L'utilisation de bouchons de Coplin contenant des résidus de colorants risque de causer une coloration artéfactuelle.
- 6. Les résultats obtenus à l'aide de ce test devront être corrélés avec les signes cliniques et d'autres tests sérologiques.
- 7. Les performances du coffret pour les échantillons autres que les sérums n'ont pas été établies.

Les lames vendues séparément sont classées comme « réactifs spécifiques d'analyte ».
Les caractéristiques analytiques et de performances ne sont pas établies, sauf comme élément de la trousse NOVA Lite dsDNA *Crithidia luciliae*.












Performances

Un substrat NOVA Lite dsDNA *Crithidia luciliae* fut utilisé pour tester divers patients atteints de maladies des tissus conjonctifs ainsi que 200 donneurs de sang choisis au hasard ont été testés. Les résultats sont fournis ci-dessous :

Groupe de patients	Nombre	NOVA Lite dsDNA <i>Crithidia luciliae</i> Nombre de positif
SLE	105	42
Lupus induit par les médicaments	24	0
Arthrite rhumatoïde	40	0
Sclérodermie	24	0
Dermatomyosite	14	0
Syndrome de Sjögren	14	0
Normaux	200	0

NOVA Lite, Inova et Inova Diagnostics sont des marques d'Inova Diagnostics, Inc. © 2018 Inova Diagnostics, Inc. Tous droits réservés.

Symboles utilises

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Conformité aux normes européennes
	Représentant européen agréé
	Sur ordonnance uniquement, conformément aux dispositions de la FDA.
	Limite de température
	Code du lot
	Numéro de catalogue ou référence
	Fabricant
	Date de péremption
	Contenu suffisant pour <n> Tests
	Consulter les instructions d'utilisation.

Références

1. Aarden LA, de Groot ER, Feltkamp TE: Immunology of DNA. III. *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the detection of anti-dsDNA with immunofluorescence techniques. Ann. NY Acad. Sci. **254**: 505-515, 1975.
2. Crowe W, Kusher I: An immunofluorescent method using *Crithidia luciliae* to detect antibodies to double-stranded DNA. Arthritis and Rheumatism **20**: 811-814, 1977.
3. Tan EM, et al.: The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism **25**: 1271-1277, 1982.
4. Arana R, Seligmann M: Antibodies to native and denatured deoxyribonucleic acid in systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest. **46**: 1867-1882, 1967.
5. Inami YH, Nakamura RM, Tan EM: Microhemagglutination test for the detection of native and single-stranded DNA antibodies and circulating DNA antigen. J. Immunol. Methods **3**: 287-300, 1973.
6. Aarden LA, Lakmaker F, de Groot ER, et al.: Detection of antibodies to DNA by radioimmunoassay and immunofluorescence. Scand. J. Rheu. Suppl. **11**: 12-19, 1975.
7. Fish F, Ziff M: A sensitive solid phase microradioimmunoassay for anti double-stranded DNA antibodies. Arthritis and Rheumatism **24**: 534-543, 1981.
8. Pincus T, Schur P, Rose JA, et al.: Measurement of serum DNA-binding activity in systemic lupus erythematosus. The New England J. of Medicine **281**: 701-705, 1969.
9. Somerfield SD, Roberts MW, Booth RJ: Double-stranded DNA antibodies: comparison of four methods of detection. J. Clin. Path. **34**: 1032-1035, 1981.
10. Sontheimer RD, Gilliam JD: An immunofluorescence assay for double-stranded DNA antibodies using the *Crithidia luciliae* kinetoplast as a double-stranded DNA substrate. J. Lab Clin. Med. **91**: 550-558, 1978.
11. Stingl G, Meingassner JG, Swelty P, Knapp W: An immunofluorescence procedure for the demonstration of antibodies to native, double-stranded DNA and of circulating DNA-anti DNA complexes. Clin. Immunol. Immunopath. **6**: 131-140, 1976.
12. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. Centers for Disease Control/National Institute of Health, 2009

Fabricant:

Inova Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America
Technical Service (U.S. & Canada Only) : 877-829-4745
Technical Service (Outside the U.S.) : 1 858-805-7950
support@inovadx.com

Australian Sponsor:

Werfen Australia Pty Ltd
59-61 Dickson Avenue
Artarmon NSW 2064 Australia
Tel. +61 2 9098 0200 / 1300 369 132
<http://au.werfen.com/>

Représentant Autorisé:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

628200FR

Août 2018
Révision 18

