

QUANTA Lite® Histone ELISA

Uniquement pour "Diagnostics In-Vitro"

Complexité de CLIA: Haut



REF 708520

Rx Only

Application

QUANTA Lite Histone est un test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) pour la détection semi-quantitative des anticorps histone dans le sérum humain. La recherche d'anticorps anti-histone peut être utilisée conjointement aux signes cliniques et à d'autres tests de laboratoire pour faciliter le diagnostic du Lupus Erythémateux Disséminé (LED), du Lupus induit par les médicaments et des maladies relatives au tissu conjonctif comme l'arthrite rhumatoïde, la dermatomyosite et le syndrome de Sjögren. La détermination des auto anticorps anti-Histones chez les patients est une aide au diagnostic différentiel entre le LED et LED médicamenteux.

Informations concernant le test

Les auto anticorps anti-Histone peuvent être détectés chez 18-53 % des patients ayant un LED.^{1,2} Plus de 95% des patients ayant un lupus induit par les médicaments ont des anticorps anti-Histone. Chez ces patients, les anticorps anti-Histone sont très largement prédominants¹⁻⁵, alors que les patients LED idiopathiques présentent une variété d'autres auto-anticorps en plus des anti-Histones. Les anticorps anti-Histone d'isotype IgG sont spécifiques au LED, alors que les anticorps IgM sont rencontrés chez des personnes saines ainsi que dans des conditions autres que le LED.^{1,6,7}

Les anticorps anti-Histone peuvent être détectés par différentes méthodes, la plus courante étant l'Immunofluorescence.⁵ Cette méthode est compliquée, subjective et ne détecte pas tous les anticorps anti-Histone de façon équivalente, notamment en ce qui concerne les sous-classes d'Histones.⁸ Depuis peu, la méthode ELISA est utilisée et permet d'éviter les inconvénients de la technique d'Immunofluorescence. La méthode ELISA est adaptée aussi bien aux tests en grande série qu'en petite série et permet la recherche d'anticorps anti-Histone en parallèle d'un panel d'autres tests ELISA détectant d'autres autoanticorps anti-nucléaires spécifiques.

Principe du test

L'antigènes purifiés d'histone de veau est purifié et fixé sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène dans des conditions qui préservent son état natif. Les contrôles pré-dilués et les sérums de dilués patients sont ajoutés dans différents puits. Une étape d'incubation permet la liaison entre les anticorps anti-histone présents dans le sérum et l'antigène immobilisé dans le puits. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique anti-IgG humaine est alors ajouté dans chaque puits pour révéler les autoanticorps du patient. Après une étape d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat chromogène suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Les résultats peuvent être évalués par comparaison entre la couleur du puits échantillon et celle des puits de contrôle.

Contenu du coffret

1. Plaque de microtitration ELISA revêtue d'antigènes Histone avec portoir de 12 barrettes de 8 micropuits en polystyrène sécables, dans un sachet d'aluminium avec un dessiccant
2. ELISA Negative Control, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain sans anticorps humains anti-Histone, dans du tampon avec du stabilisateur
3. Histone ELISA Low Positive, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain avec des anticorps humains anti-Histone, dans du tampon avec du stabilisateur
4. Histone ELISA High Positive, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain avec des anticorps humains anti-Histone, dans du tampon avec du stabilisateur
5. HRP Sample Diluent, teinté en rose, 1 flacon de 50 ml contenant du tampon Tris salin, du Tween 20, des stabilisateurs de protéines et des conservateurs
6. HRP Wash Concentrate (40x) – tampon Tris salin avec du Tween 20, teinté de rouge, 1 flacon de 25 ml. Consulter le paragraphe "Méthode" pour la dilution.
7. HRP IgG Conjugate, anticorps de chèvre anti-IgG humaines dans du tampon avec des stabilisateurs de protéines et des conservateurs, teinté en bleu, 1 flacon de 10 ml
8. TMB Chromogen, avec stabilisateurs, 1 flacon de 10 ml
9. HRP Stop Solution, acide sulfurique 0,344M, non teinté, 1 flacon de 10 ml

Avertissements

1. ATTENTION: Le diluant des échantillons, les contrôles et le conjugué contiennent 0,02% de chloramphénicol, considéré comme cancérogène dans l'état de Californie.
2. Tout le matériel d'origine humain utilisé pour la préparation des contrôles a été testé et trouvé négatif lors de la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-anticorps 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.⁹

3. 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. Eviter 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.
4. Le conjugué Peroxydase HRP contient un composant chimique dilué qui est un poison corrosif, toxique en cas d'ingestion en grande quantité. Pour éviter des brûlures chimiques, il est recommandé d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux.
5. Le chromogène TMB est irritant et peut être toxique en cas d'inhalation, d'ingestion et d'absorption en grande quantité. Eviter tout contact avec la peau ou les yeux et toute inhalation.
6. La solution d'arrêt HRP est une solution diluée d'acide sulfurique. Eviter de l'exposer aux bases, aux métaux, aux oxydants ou tout autre composé susceptible de réagir avec les acides. L'acide sulfurique est toxique et corrosif en cas d'absorption. Eviter le contact avec la peau et les yeux pour éviter toute brûlure chimique.
7. Lors de la manipulation de ces produits, utiliser les équipements de protection personnelle appropriés.
8. Les éclaboussures de réactifs doivent être nettoyées immédiatement. Respecter les règlements en vigueur concernant l'élimination des déchets.

Précautions

1. Ce test est pour un usage diagnostic 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 et une aspiration insuffisante du liquide dans les puits d'ELISA entraînent des imprécisions et un bruit de fond élevé.
4. L'automatisation, complète ou partielle, du traitement des échantillons dans ce test peut produire des différences de résultats par rapport au traitement manuel. Chaque laboratoire est responsable de la validation des procédures automatiques afin que les résultats des tests restent dans les limites acceptables.
5. Un certain nombre de facteurs influencent la performance du test: la température initiale des réactifs, la température ambiante, l'exactitude et la reproductibilité de la technique de pipetage, la qualité du lavage et de vidange des puits d'ELISA, le photomètre utilisé pour mesurer les résultats et la durée des temps d'incubation pendant le test. Il est donc recommandé de prêter attention à tous ces facteurs pour obtenir des résultats reproductibles et rigoureux.
6. Il est recommandé de suivre strictement le protocole. Chaque modification est au risque de l'utilisateur.
7. La fermeture incomplète de la pochette contenant les puits de microtitration et le dessiccant entraîne la dégradation de l'antigène et en conséquence une mauvaise précision des résultats.
8. Des valeurs faibles et inacceptables d'absorption peuvent être progressivement observées dès le **deuxième** prélèvement dans le même flacon de conjugué HRP. Il est donc important de suivre exactement les instructions fournies pour éviter ce risque.
9. Un nettoyage ou rinçage inapproprié des appareils et instruments pourrait provoquer une contamination chimique du conjugué HRP. Des résidus de produits chimiques courants de laboratoire comme le formol, l'eau de javel, l'éthanol ou les détergents, entraînent la dégradation progressive du conjugué HRP. Il est absolument recommandé de rincer abondamment tous les instruments et appareils après l'utilisation des détergents chimiques.

Conditions de conservation

1. Conserver tous les réactifs du 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. Les puits non utilisés devront être remis dans l'emballage en aluminium avec le dessiccant, bien refermé et stocké à 2-8°C.
3. La solution de tampon diluée reste stable une semaine à 2-8°C.

Échantillons

Ce test doit être réalisé avec des sérums comme échantillons. 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 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

- 1 Histone ELISA Plate (12-1 x 8 puits), avec support
- 1 1,2 ml ELISA Negative Control, pré-dilué
- 1 1,2 ml Histone ELISA Low Positive, pré-dilué
- 1 1,2 ml Histone ELISA High Positive, pré-dilué

- 1 50 ml HRP Sample Diluent
- 1 25 ml HRP Wash Concentrate (40x)
- 1 10 ml HRP IgG Conjugate, anti-IgG humaines (chèvre)
- 1 10 ml TMB Chromogen
- 1 10 ml HRP Stop Solution (acide sulfurique 0,344M)

Autre matériel nécessaire non fourni

Pipettes 5, 100, 200-300 et 500 µl

Cônes jetables

Tubes de 4ml pour la dilution de sérum

Eau distillée ou déionisée

Récipient de 1 litre pour le tampon de lavage HRP dilué

Lecteur ELISA avec filtre de 450nm (et 620nm pour les lectures à double longueur d'ondes)

Méthode

Préparation du test

1. Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26°C) et bien les mélanger avant de les utiliser.
2. Diluer la totalité de la solution de lavage (25ml) avec 975 ml d'eau distillée (1/40). La solution de tampon diluée reste stable une semaine à 2-8°C. Si la totalité de la plaque de microtitration n'est pas utilisée en une seule fois, un plus petit volume de tampon sera suffisant, par exemple pour traiter 16 puits, diluer 2ml de tampon concentré dans 78ml d'eau distillée.
3. Préparer les sérum des patients en les diluant au 1/101 dans le diluant d'échantillon (5µl dans 500µl). Les sérum doivent être utilisés dans les 8 heures qui suivent leur dilution. **Ne pas diluer** les contrôles ELISA fortement positif, faiblement positif en Histone et négatif.
4. La détermination de la présence ou de l'absence de la Histone en unités arbitraires nécessitent deux puits pour chacun des trois contrôles et un ou deux puits pour chacun des sérum de patients. Il est recommandé de tester les échantillons en double.

Exécution du test

1. **PORTEZ TOUS LES REACTIFS ET LES ECHANTILLONS À TEMPERATURE AMBIANTE (20-26°C) AVANT DE LES UTILISER.** Placer le nombre nécessaire de micro puits ou de barrettes sur le portoir. **Remettre immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette en aluminium avec le dessiccant, fermer hermétiquement pour éviter toute condensation de vapeur d'eau.**
2. Distribuer 100 µl de chacun des contrôles ELISA fortement, faiblement positifs en Histone et négatif **pré-dilués** et de sérum des dilués patients dans les puits. Recouvrir les barrettes et laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante. Le temps d'incubation commence après l'ajout du dernier échantillon.
3. Lavage: aspirer le contenu de tous les puits. Ajouter 200-300µl de tampon **dilué** dans tous les puits et l'aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération deux fois supplémentaires pour un total de trois lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque en la tapotant sur du papier absorbant, pour enlever tout liquide de lavage résiduel. Pour l'aspiration, maintenir la même séquence que celle utilisée lors de la distribution des échantillons.
4. Distribuer 100 µl de conjugué HRP IgG dans chaque puits. Le conjugué doit être prélevé du flacon dans des conditions aseptiques. **Prélever en une seule fois la quantité de conjugué nécessaire à la réalisation de la série. POUR EVITER LE RISQUE DE CONTAMINATION, NE JAMAIS REMETTRE LE RESTE DU CONJUGUE NON UTILISE DANS LE FLACON.** Recouvrir les barrettes et incuber pendant 30 minutes à température ambiante, comme décrit à l'étape 2.
5. Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 3.
6. Distribuer 100 µl de chromogène TMB dans chaque puits et laisser incuber à l'**obscurité** 30 minutes à température ambiante.
7. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt HRP dans chaque puits. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du chromogène TMB. Tapoter délicatement les plaques pour bien mélanger le contenu des puits.
8. Lire la densité optique (DO) de chaque puits à 450nm dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction. Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence peut être 620nm.

Contrôle de qualité

1. Les contrôles ELISA fortement positif Histone, faiblement positif en Histone et négatif doivent être inclus à chaque série de tests afin de s'assurer du bon fonctionnement des réactifs et du bon déroulement de la procédure.
2. Etant donné que les contrôles ELISA fortement positifs Histone, ELISA faiblement positifs Histone et négatifs sont pré-dilués, il n'est pas possible de valider le procédé de dilution des échantillons.
3. Des contrôles de qualité supplémentaires peuvent être réalisés selon les directives nationales, les réglementations internationales ou celles des organismes d'accréditation. Des contrôles appropriés peuvent être obtenus en aliquotant un pool de sérum humain conservé à une température inférieure ou égale à -20°C.
4. Pour valider les résultats obtenus, tous les critères décrits ci-dessous devront être vérifiés. Si un ou plusieurs de ces critères ne sont pas réalisés, le test devra être considéré comme non valide et à refaire.

- a. La densité optique du Contrôle ELISA fortement positif en Histone pré-dilué doit être supérieure à celle du contrôle ELISA faiblement positif en Histone pré-dilué. D'autre part, la densité optique du contrôle ELISA faiblement positif en Histone doit être supérieure à celle du contrôle ELISA négatif pré-dilué.
- b. La densité optique du contrôle ELISA fortement positif en Histone pré-dilué doit être supérieure à 1,0. Celle du contrôle négatif pré-dilué doit être inférieure à 0,2.
- c. L'absorbance du Contrôle ELISA faiblement positif en Histone doit être deux fois supérieure à celle du contrôle négatif d'ELISA ou supérieure à 0,25.
- d. Les contrôles ELISA négatif et ELISA fortement positif en Histone permettent de contrôler le bon fonctionnement des tests. Le Contrôle ELISA fortement positif en Histone n'assure pas la précision de la valeur seuil du test.
- e. L'utilisateur du test peut se référer au document C24-A3 du NCCLS pour des informations supplémentaires concernant le contrôle qualité.

Calcul des résultats

Déterminer d'abord la valeur moyenne des duplicates. La réactivité de chaque échantillon est calculée en divisant la DO moyenne de l'échantillon par la DO moyenne du contrôle faible et multiplier le résultat obtenu par la valeur (en unités) affectée au contrôle faible.

La valeur en unités est indiquée sur l'étiquette du flacon de contrôle ELISA positif faible en Histone.

$$\text{Valeur de l'échantillon} = \frac{\text{DO de l'échantillon}}{\text{DO du contrôle faible}} \times \text{valeur du contrôle faible}$$

(unités) (unités)

La réaction n'évolue pas de manière linéaire en fonction de la quantité d'anticorps présents dans le sérum. L'augmentation et la diminution de la concentration d'anticorps se traduisent par une augmentation ou une diminution de réactivité correspondante mais ces modifications du signal ne sont pas proportionnelles (par exemple un doublement de la quantité d'anticorps ne fera pas doubler le signal). Pour une évaluation quantitative rigoureuse des anticorps du patient, il faudra réaliser des dilutions séries du sérum. Dans ce cas, la dernière dilution du sérum qui donne encore un signal positif sera considéré comme étant le titre en anticorps du patient.

Interprétation des résultats

Le test ELISA est une technique très sensible et peut en conséquence détecter de très faibles différences au sein d'un groupe de patients. Les valeurs limites détaillées dans le paragraphe "calcul des résultats" sont indicatives. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs seuils d'interprétation en fonction de ses techniques, contrôles, équipements et populations de patients.

Les échantillons peuvent être interprétés comme négatifs, faiblement, modérément ou fortement positif selon les valeurs en unités détaillées ci-dessous:

	Unités
Négatif	<1,0
Faiblement positif	1,0 – 1,5
Modérément positif	1,6 – 2,5
Fortement positif	>2,5

1. Un résultat positif indique la présence d'anticorps Histone et la possibilité du Lupus Erythémateux Disséminé (LED), du Lupus induit par les médicaments ou de maladies relatives au tissu conjonctif comme l'arthrite rhumatoïde, la dermatomyosite ou le Syndrome de Sjögren.
2. Un résultat négatif indique l'absence d'anticorps anti-histone ou bien un taux d'anticorps en dessous de la valeur seuil.
3. Nous suggérons de rendre les résultats avec la remarque suivante: "Les résultats suivants ont été obtenus avec le test ELISA Inova QUANTA Lite Histone. Les valeurs d'anti-histone obtenues avec des tests de différents fabricants ne sont pas interchangeables. Le taux d'anti-IgG trouvé n'est pas corrélé à une titration en point final."

Limites du test

1. La présence de Complexes Immuns ou d'autres agrégats d'Immunoglobulines dans le sérum humain peut entraîner l'augmentation d'une liaison non spécifique et des résultats faussement positifs.
2. Tous les LED ou Lupus induits par les médicaments ne sont pas positifs pour les anticorps anti-Histone.
3. Les résultats obtenus à l'aide de ce test devront être corrélés avec les signes cliniques et d'autres tests sérologiques.
4. Les performances du coffret pour les échantillons autres que les sérum n'ont pas été établies.

Performances

La capacité du test ELISA QUANTA Lite Histone à détecter les anticorps anti-histone, a été évaluée en comparaison avec un autre test ELISA du commerce. Les résultats du test ELISA ont été interprétés selon les instructions du fabricant.

Valeur normale

106 sérum pris au hasard ont été testés par la méthode ELISA QUANTA Lite Histone. Sur l'ensemble de ces échantillons, 2 avaient une absorption supérieure ou égale à 1,0 (un résultat positif pour ce test). L'un des deux échantillons était aussi anti-Histone positif avec le test de référence utilisé et également positif avec

deux tests IFT Indirects. En conséquence, ce sérum a été éliminé du groupe de sérum de la population normale. Le deuxième sérum était négatif avec l'autre test de référence et également négatif avec les deux tests IFT indirects. Ce dernier sérum a donc été laissé parmi ceux de la population normale. La valeur moyenne des échantillons était de 0,16 unités avec un écart type de 0,13 unités, les valeurs variant de 0,04 à 1,11 unités. La valeur moyenne est inférieure à la valeur seuil pour une valeur égale à 6,5 fois celle de l'écart type.

Sensibilité et spécificité relatives

Pour déterminer la sensibilité et la spécificité relatives, 42 sérums ont été testés avec la méthode ELISA anti-Histone de Inova et d'autres fabricants. Sur les 42 échantillons testés, 14 étaient positifs et 28 négatifs avec les deux méthodes. Aucun échantillon n'a montré un résultat faux positif ou faux négatif en comparaison avec la méthode de référence.

Inova					
	+	-			
Méthode de référence	+	14	0	Sensibilité Relative	100%
	-	0	28	Spécificité Relative	100%
				Efficacité Relative	100%

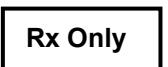
Précision

Un sérum fortement négatif, un sérum faiblement positif et un sérum négatif ont été testés chacun en 6 fois par essais dans 4 essais séparés. La valeur moyenne du sérum fortement positif est de 3,42, celle du sérum faiblement positif de 1,34 et celle du sérum négatif de 0,28. Les écarts type (ET) et les coefficients de variation (CV) de chaque échantillon sont résumés dans le tableau ci-dessous:

	Négatif		Fortement positif		Faiblement positif	
	ET	CV	ET	CV	ET	CV
Global	0,014	4,8%	0,270	8,0%	0,040	3,8%
Intra-essais	0,010	3,4%	0,158	4,6%	0,051	3,8%
Inter-essais	0,014	4,8%	0,260	7,8%	0,037	2,8%

QUANTA Lite, Inova et Inova Diagnostics sont des marques d'Inova Diagnostics, Inc. © 2019 Inova Diagnostics, Inc. Tous droits réservés.

Symboles utilisés

	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. Rubin RL, et. al.: Specificity of antihistone antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 779, 1982.
2. Klajman A, et. al.: The prevalence of antibodies to histone induced by procainamide in old people, in cancer patients and in rheumatoid like disease. *Clin Immunol Immunopathol* 27: 1, 1983.
3. Biundo JJ and Cummings NA: Biochemical, hematologic and immunologic tests, *Rheumatic Disease, Diagnosis and Management*. Edited by AW Katz, Philadelphia, JB Lippincott, p.265, 1977.
4. Epstein A and Barland P: The diagnostic value of antihistone antibodies in drug-induced lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 28: 158, 1985.
5. Fritzler MJ and Tan EM: Antibodies to histones in drug-induced and idiopathic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 62: 560, 1978.
6. Krippner H, et. al.: Antibodies to histones of the IgG and IgM class in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 58: 49, 1984.
7. Gockel S and Binder WL: Immunoglobulin class specificity of antihistone. *Arthritis Rheum (suppl)* 28: 558, 1985.
8. Portanova JP, et. al.: Reactivity of anti-histone antibodies induced by procainamide and hydralazine. *Clin Immunol Immunopathol* 25: 67, 1982.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control/National Institutes of Health, 2007, Fifth Edition.

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

628520FR

Avril 2019
Révision 20

