

DNA-LISA

REF **HM 002**



DÉFINITION

Le coffret **DNA-LISA** permet le dosage des anticorps dirigés contre l'ADN natif dans le sérum humain, par méthode immunoenzymatique.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les connectivites sont des maladies auto-immunes systémiques dont le classement repose sur des critères cliniques et biologiques. Le critère biologique s'appuie sur la mise en évidence des anticorps anti-nucléaires.

Parmi ceux-ci, les anticorps anti-ADN natif sont considérés comme le marqueur sérologique majeur du Lupus Erythémateux Systémique (LES). Leur spécificité et leur sensibilité leur confèrent une haute valeur diagnostique. A ce titre, ils font partie des critères cliniques et biologiques retenus en 1982 par l'American Rheumatism Association (ARA) pour le diagnostic du LES.

La détection des anticorps anti-ADN natif est particulièrement utile à deux niveaux : en tant qu'aide au diagnostic du LES et en tant que moyen de surveillance de l'évolution de la maladie.

Pour ce second point, les prélèvements répétés de sérum auprès du patient peuvent se révéler très informatifs dans la mesure où il existe une corrélation entre les anti-ADN natif et l'activité de la maladie : les poussées lupiques sont généralement précédées d'une élévation du taux d'anticorps anti-ADN natif, suivie par une chute brutale pendant l'aggravation (particulièrement dans les glomérulonéphrites).

D'autre part, les différents traitements ont des effets variables sur les taux d'anti-ADN natif et peuvent être adaptés par un suivi régulier de ces anticorps.

ECHANTILLONS

- Le dosage d'anticorps peut être effectué sur sérum.
- Eviter d'utiliser des sérums lipémiques, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus de 1 fois.
- Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 7 jours maximum, sinon congelés.
- Afin de limiter toute fixation non spécifique, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

PRINCIPE DU TEST

L'antigène, ADN natif, est adsorbé sur un support solide constitué de 12 barrettes de 8 micropuits en plastique.

- Dans un premier temps, l'échantillon à tester est dilué puis mis à incuber dans les puits de la microplaque. S'il contient les anticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer sur l'antigène. Après incubation, les anticorps non fixés sont éliminés par lavage.
- On ajoute ensuite un conjugué monoclonal de souris anti-IgG humaines couplées à la peroxydase de Raifort qui se fixe au complexe Antigène-Anticorps précédemment formé. Après incubation, l'excès de conjugué est éliminé par un second lavage.

- L'étape de chromogénèse est réalisée en déposant le substrat de l'enzyme: ABTS (2,2 Azino-di-[3-sulfonate déthyl benzthiazoline]). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon.

- L'addition de H₂SO₄ (0.25 M) permet de bloquer la réaction enzymatique.

- La lecture des densités optiques à 405nm sur un lecteur de microplaques constitue la dernière étape de réalisation du test.

- Une gamme d'étalonnage constituée de 4 étalons, permet, par interpolation, de définir le titre du sérum patient.

Les titres des étalons (UI/ml) sont standardisés par rapport à la référence internationale : Wo/80 WHO.

COMPOSITION DU COFFRET

1 plaque de 12 barrettes recouverts d'ADN natif MP	12 barrettes
4 flacons d'étalons titrés en unités internationales (WHO) <u>Prêt à l'emploi</u> CAL n Les titres sont indiqués sur l'étiquette du flacon.	4 x 1,5ml
1 flacon de contrôle positif titré en unités internationales (WHO) <u>A diluer</u> CONTROL + Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon.	1 x 350µl
1 flacon de contrôle négatif <u>A diluer</u> CONTROL -	1 x 350µl
1 flacon de tampon Phosphate-Tween pH 7.2 - Concentré 10 fois - <u>A reconstituer en eau distillé</u> BUF WASH 10x	1 x 100ml
1 flacon de conjugué anti-IgG humaines couplées à la peroxydase. <u>Prêt à l'emploi.</u> CONJ IgG	1 x 15ml
1 flacon de substrat (ABTS) <u>Prêt à l'emploi</u> SUBS ABTS	1 x 15ml
1 flacon de solution d'arrêt H ₂ SO ₄ (0.25 M) <u>Prêt à l'emploi</u> SOLN STOP	1 x 15ml

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Eau distillée
- Pipettes de précision
- Lecteur muni d'un filtre 405 nm
- Peigne de lavage 8 canaux.

STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Les réactifs et les barrettes de puits sensibilisées doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Après la première ouverture, conserver les barrettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet déshydratant et les remettre immédiatement entre +2°C et +8°C. Remettre immédiatement entre +2°C et +8°C, les réactifs non utilisés.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

L'ensemble des réactifs doit être préparé extemporanément.

1. Tampon de dilution et de lavage (TDL)

- Diluer le Phosphate-Tween concentré au 1/10 en eau distillée.
- Durée de conservation : 3 mois entre +2°C et +8°C.
Remarque : En présence de cristaux dans la solution concentrée, placer le flacon 15min. à +37°C avant utilisation.

2. Préparation des échantillons et des contrôles

- Diluer les échantillons au 1/101 dans le tampon TDL.
Ex : 10µl d'échantillon qsp 1ml de TDL.
- Agiter vigoureusement au vortex.

3. Utilisation du conjugué - prêt à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et le transférer dans un tube à partir duquel se fera le dépôt.

4. Utilisation du substrat – prêt à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et le transférer dans un tube à partir duquel se fera le dépôt.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Retirer tous les réactifs hors de leur logement de conditionnement et les ramener impérativement à température ambiante (+18°C / +25°C) au minimum une demi-heure avant de commencer le dosage.

♣ La température des réactifs peut influencer le résultat final. S'assurer que les plaques soient bien égouttées après chaque lavage.

Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.

L'étalon et les contrôles sont d'origine humaine. Pour chacun, les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2, anti-HCV et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.

Les réactifs en solutions (excepté la solution d'arrêt) contiennent comme agent de conservation, de l'azide de sodium à une concentration <0.1% (w/v) ou du ProClin® 300 à 0.02% (w/v). Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs lors de son élimination dans les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

Le coffret **DNA-LISA** a été élaboré dans le respect des Directives européennes 67/548/CEE et 1999/45/CE en ce qui concerne la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses.

DNA-LISA a été optimisé pour les conditions opératoires précisées dans cette notice. Le non-respect des dilutions, de la préparation des réactifs, du protocole ou la substitution d'un réactif par un autre produit peuvent affecter les performances finales du test.

MODE OPÉRATOIRE

1. Préparation du test

Utiliser la feuille de travail contenue dans le coffret pour noter la localisation des échantillons.

Prévoir :

- 1 puits « blanc réactif » (constitué par du TDL)
- 2 x 4 puits pour les étalons (dépôts en double)
- 2 x 1 puits pour chaque contrôle (dépôts en double)
- Pour une meilleure précision des résultats il est recommandé de déposer également les échantillons en double.
- Extraire ensuite le nombre exact de puits nécessaires et les disposer sur le support plastique.

2. Incubation des contrôles et des échantillons

Déposer 100µl d'étalons, contrôles ou échantillons dilués.

Laisser incuber 30 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300µl/puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

3. Incubation du Conjugué

Déposer 100µl de conjugué dans tous les puits.

Incuber 30 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300µl/puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

4. Incubation du Substrat

Déposer 100µl de substrat dans chaque puits.

Incuber 30 minutes à température ambiante.

5. Arrêt de la réaction

Ajouter 100µl de H₂SO₄ (0.25 M) dans chaque puits.

6. Lecture

Lire la densité optique de chaque puits avec un lecteur de microplaques muni d'un filtre 405nm au cours des 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction.

Faire le zéro de l'appareil sur le puits "blanc réactif".

RÉSULTATS

Étalonnage en 4 points

- Calculer les DO moyennes pour les étalons, les contrôles et les échantillons patients (si ils ont été traités en double).
- Tracer la courbe d'étalonnage sur du papier logarithmique en portant en abscisses (axe des X) les unités des points étalons et en ordonnées (axe des Y) les densités optiques (DO) correspondantes.

Remarques :

- La DO moyenne de l'étalon 4 doit être au moins égale à 0.8
- Le coefficient de régression linéaire doit être supérieur à 0,990 pour que les essais soient validés.
- Les échantillons présentant des valeurs supérieures à celle de l'étalon le plus élevé peuvent être dilués au 1/400 afin d'obtenir une meilleure précision. Le nombre d'unités sera alors multiplier par 4.

INTERPRÉTATION DES RESULTATS

Unités Internationales (WHO)	< 35 UI/ml	35-55 UI/ml	> 55 UI/ml
Résultats	Négatif	Limite*	Positif

*: Les résultats limites doivent être contrôlés sur un second prélèvement quelques semaines plus tard et interprétés en fonction d'examen complémentaires et du contexte clinique.

LIMITES

Du fait des différences qui peuvent exister entre les laboratoires et les régions en rapport avec la population, l'alimentation, les techniques du laboratoire et la sélection des groupes de référence, il est important pour chaque laboratoire d'établir la validité des valeurs de référence suggérées ci-dessus.

Les sérums hémolysés, lipemiques, icteriques, présentant des taux élevés en IgG monoclonal, des complexes immuns ou des facteurs rhumatoïdes peuvent entraîner des résultats faussement positifs.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le coffret contient un contrôle positif et un contrôle négatif. Il est conseillé de les doser pour chaque série réalisée. Les valeurs obtenues pour le contrôle positif doivent être comprises dans l'intervalle des valeurs précisées sur l'étiquette du flacon. Si les résultats des contrôles ne sont pas conformes aux résultats attendus, les essais doivent être répétés.

bmd propose, en complément, un contrôle multiparamétrique (Immuno-Trol I, réf.: HM036 ou Immunotrol IV, réf. : HM051) qui peut être testé en parallèle. Tous deux renferment des anticorps anti-ADN natif. Il sont à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

1. SENSIBILITE, SPECIFICITE, CONCORDANCE PAR RAPPORT À UN AUTRE COFFRET ELISA

Le nouveau coffret **DNA-LISA** développé en Peroxidase par bmd a été comparé à un coffret ELISA commercialisé.

L'étude a porté sur 338 échantillons dont :

- ⇒ 47 échantillons positifs en anticorps anti-ADN natif avec la technique de référence.
- ⇒ 291 échantillons négatifs en anticorps anti-ADN natif avec la technique de référence.

Résultats

		ELISA de référence		
		+	-	
bmd DNA-LISA	+	45	14	Sensibilité relative : 97.8%
	-	1	278	Spécificité relative : 95.2%
				Concordance : 95.6%

2. PRÉCISION DU TEST

Estimée sur 3 échantillons positifs : faiblement positif, positif et fortement positif.

Intra-essai (10 tests dans le même essai)		Inter-essais (4 tests dans 5 essais différents)	
Titres moyens	CV (%)	Titres moyens	CV (%)
320	2.0	350	5.0
86	5.0	108	11.0
48	6.0	51	11.0

BIBLIOGRAPHIE

- AHMAN A et al. Molecular expression systems for anti-DNA antibodies - 1 - 2. Lupus 2002, 11, 824-832, 833-842.
- CONRAD K. et al. Autoantibodies – Diagnostic, pathogenic and prognostic relevance. Clin. and Exp. Rheumatol. 1997 ;15, 457-465
- HOLLINGSWORTH P.N. et al. Antinuclear antibodies In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, 1996, Amsterdam.74-90.
- HOMBURGER H.A. Cascade testing for autoantibodies in connective tissue disease. Mayo Clin. Proc., 1995, 70, 183-184.
- ISENBERG et al. Clinical laboratory assays for measuring anti-dsDNA antibodies. Where are we now? Lupus 2002, 11, 797-800.
- RAHMAN A et al. Anti-DNA antibodies – structure and function. Lupus 2002, 11, 776-779.
- RAVIRAJAN CT et al. An analysis of clinical disease activity and nephritis associated serum autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. Rheumatology 2001, 40, 1405-1412.
- SMEENK RJ et al. dsDNA autoantibodies. In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, 1996, Amsterdam.227-234.

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	QUANTITÉ À DISTRIBUER	REACTIFS	CONDITIONS D'INCUBATIONS
INCUBATION	100µl	Tampon TDL: blanc réactif	30 mn Température Ambiante
	100µl	Etalons : puits étalons (en double)	
	100µl	Contrôles dilués (en double)	
	100µl	Echantillons dilués	
LAVAGE	Laver 3 fois au tampon de dilution et de lavage (300µl/puits)		
⚠ <i>Eliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant</i>			
ETAPE CONJUGUÉ	100µl	Anti-IgG PEROX prêt à l'emploi	30 mn Température Ambiante
LAVAGE	Laver 3 fois au tampon de dilution et de lavage (300µl/puits)		
⚠ <i>Eliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant</i>			
RÉACTION ENZYMATIQUE	100µl	Solution substrat ABTS	30 mn Température Ambiante.
ARRÊT DE LA RÉACTION	100µl	Solution d'arrêt H ₂ SO ₄ (0.25M)	

INDEX DES SYMBOLES



Déclaration de conformité CE



Test ELISA



Dispositif de Diagnostic *In Vitro*



Référence produit



Numéro de Lot



Date d'expiration



Nombre de tests



Consulter les instructions d'utilisation



Limites de température



Risque biologique



Contient de l'azide de sodium



A reconstituer

BioMédical Diagnostics SA

Siège social

Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tél : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com



DNA-LISA

REF **HM 002**



DEFINITION

The **DNA-LISA** kit is an enzyme linked immunoassay for the quantitative determination of anti-dsDNA antibodies in human serum.

DIAGNOSTIC VALUE

Connective diseases are systemic auto-immune diseases. Their classification is based upon clinical and biological data. Biological criteria is based on the detection of anti-nuclear antibodies.

Among them, anti-dsDNA (ds: double strength) antibodies are recognized as the major serologic marker of Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Their specificity and their sensitivity give them a high diagnostic value. Therefore they are a part of the clinical and biological criteria established in 1982 by the American Rheumatism Association (ARA) for the diagnosis of the SLE.

The detection of anti-dsDNA antibodies is particularly useful in two different ways : as an aid to the diagnosis of SLE and as a tool to monitor the course of the disease.

For the second purpose repeated serum sampling of individual patients can be very informative about the clinical course of the disease because a relationship exists between anti-DNA and diseases activity : flares of SLE are generally preceded by a rise in anti-dsDNA levels, followed by a steep drop during the exacerbation (particularly in nephritis).

Furthermore different treatments of patients have varying influences on anti-dsDNA levels and can be adapted by a regular follow-up of these antibodies.

SAMPLES COLLECTION AND HANDLING

- The test is performed on serum.
- Lipemic or hemolyzed sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- If the test is not run immediately, the samples should be stored at +2°C/+8°C for a maximum of 7 days, for longer storage, frozen undiluted samples at -20°C.
- To avoid non-specific binding, it is recommended to centrifuge and filter the cloudy samples or samples frozen for more than 6 months.

ASSAY PRINCIPLE

dsDNA antigen is coated on to wells of a polystyrene microtiter plate (12 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the coated well for binding. After incubation, unbound antibodies are removed by washing.
- Then, a murine monoclonal anti-human IgG conjugated to horseradish peroxidase is added to each of the wells. The conjugate binds to the antigen-antibody complex. After incubation, the excess conjugate is removed by a second wash.

- The chromogenic step is performed by the addition of substrate ABTS (2,2 Azino-di-[3-sulfonate déthyl benzthiazoline]). During this step, a colour will develop in proportion to the amount of antibody in the sample.

- Addition of Stop Solution H₂SO₄ (0.25 M) serves to stop the enzymatic reaction.

- After stopping the reaction by H₂SO₄ (0.25M), the optical density is read by a spectrophotometer at 405nm

- Anti-dsDNA levels of sample patients are calculated using a standard curve of 4 standards.

Titers of anti-dsDNA standards are expressed in IU/ml (International Standard for dsDNA Wo/80).

REAGENTS

dsDNA antigen coated microplate with individual breakaway wells (12x8), with holder. MP	12 strips
4 standards titered in international units (WHO) <u>Ready to use</u> Each titer is printed on the vial label. CAL n	4 x 1,5mL
1 vial of positive control titered in international units (WHO) <u>To dilute</u> Expected values after dilution are printed on the vial label. CONTROL +	1 x 350µL
1 vial of negative control <u>To dilute</u> CONTROL -	1 x 350µL
1 vial of phosphate-Tween buffer pH 7.2: to be reconstituted with distilled water. <u>10X concentrated.</u> BUF WASH 10x	1 x 100mL
1 vial of anti-human IgG conjugated to horseradish peroxidase <u>Ready to use.</u> CONJ IgG	1 x 15mL
1 vial of substrat solution (ABTS) <u>Ready to use</u> SUBS ABTS	1 x 15mL
1 vial of stop solution H ₂ SO ₄ (0.25M) <u>Ready to use</u> SOLN STOP	1 x 15mL

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- distilled water
- precision pipettes
- microplate spectrophotometer with 405nm filter
- 8 channel pipettes

STABILITY AND STORAGE

- Store reagents and assay strips at +2°C/+8°C in their own package.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- Store unused strips into their plastic bag with the desiccant.
- Store all components immediately after use again at +2°C/+8°C.

SETUP

All the reagents should be prepared as required:

1. Dilution and washing buffer.

- Dilute the concentrated Phosphate-Tween at 1/10 in distilled water.
- Storage period: 3 months at +2°C/+8°C.

NB. If there are crystals in the concentrated solution, warm the bottle to +37°C for 15 minutes before use.

2. Preparation of samples and controls

- Dilute samples and controls at 1/101 in "dilution and washing buffer".
(10µL of sample + 1mL of "dilution and washing buffer")
- Vortex vigorously.

3. Use of ready-to-use conjugate.

- Estimate amount required for handling and transfer to a tube.

4. Use of ready-to-use substrate.

- Estimate amount required for handling and transfer to a tube.

PRECAUTIONS

Place all reagents outside of their packaging location. They must be necessarily returned to ambient temperature (+18°C/+25°C) at least one half an hour before beginning the test.

⚠ The temperature of the reagents could disturb the final result.

Check that all plates are well drained after each wash.

Avoid to use reagents if signs of contamination or other visible changes occur.

Human sources for the preparation of standards and controls have been tested and found negative for antibody to HIV 1 and 2, antibody to hepatitis C virus and hepatitis B virus antigen. Nevertheless, no test can offer complete assurance that HIV, hepatitis B virus or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled as potentially infective materials.

Reagents in solution (except for substrate buffer and stop solution) contain less than 0.1% (w/v) sodium azide and 0.02% (w/v) of Proclin® 300. Do not eat and avoid contact with skin and eyes. Azide can form explosive mixtures in copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.

DNA-LISA has been developed according to E.C Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labeling of dangerous preparations.

DNA-LISA has been optimized for the use as described in this procedure. Do not substitute other manufacturer's reagents. Dilution or adulteration of these reagents may also affect the performance of the test. Close adherence to the test procedure will assure optimal performance.

METHOD

1. Preparing the test

Use the work sheet to note the sample locations, set out:

- 1 "blank reagent" well (made up with TDL)
- 4 "standards" wells (in duplicate)
- 1 well for each control (in duplicate)
- To improve the results reproducibility it is recommended to run the samples in duplicate.
- Remove the exact number of wells needed for the series and place them on the plastic support.

2. Samples incubation

Add 100µL of standards or calibrator, diluted controls or samples.

Incubate for 30 minutes at room temperature.

Wash step:

Remove the contents of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with dilution and washing buffer (300µL/well).

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess liquid.

3. Conjugate incubation

Add 100µL of conjugate.

Incubate for 30 minutes at room temperature.

Wash step:

Remove the contents of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with dilution and washing buffer (300µL/wells).

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess liquid.

4. Substrate incubation

Add 100µL substrate into each well.

Incubate for 30 minutes at room temperature.

5. Stop reaction

Add 100µL of H₂SO₄ (0,25M) to each well.

6. Reading

Read the optical density of each well at 405 nm against the reagent blank set at zero absorbance within 30 minutes.

RESULTS

Standard curve

- Determine the mean optical density for all duplicate readings.
- Trace the standard curve on log-log paper, plotting the units of the 4 standard points along the abscissa (X axis) and the corresponding OD values along the ordinate (Y axis).

Comments:

- The mean OD of the standard 4 should be at least 0.8.
- The linear coefficient of regression should be higher than 0.990 for the validation of tests.
- The samples with values greater than that of standard 4 may be diluted to 1/400 to obtain a more precise result. The number of units should be multiplied by 4.

INTERPRETATION OF RESULTS

International units (WHO)	< 35 IU/mL	35-55 IU/mL	> 55 IU/mL
Results	Negative	Borderline*	Positive

*: Borderline results should be controlled on a second sample and the interpretation of the results should be done in the frame of additional testing and taking into account the clinical status of the patient.

LIMITS

Because of differences which may exist between laboratories and locations with respect to population, diet, laboratory technique and selection of reference groups, it is important for each laboratory to establish the validity of the above suggested range.

Hemolytic, lipemic, icteric samples or samples with abnormal concentration of IgG and/or complement levels or samples with rheumatoid factor may confound the results of this assay.

QUALITY CONTROL

The kit contains positive and negative controls. Both positive and negative controls should be included with each run of the test. Positive control concentration should fall within the range printed on the Positive control label. If either reagent control is invalid, the test should be repeated.

bmd offers a multiparametric quality control (Immunotrol I, Cat. No: HM036 or Immunotrol IV, Cat. No: HM051) which contain antibodies directed against dsDNA antigens. They must be handled in the same way as samples.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCE OF THE TEST

1. SENSITIVITY, SPECIFIC AFFINITY AND AGREEMENT TO OTHER METHODS

The new peroxidase **DNA-LISA** kit has been compared to a marketed ELISA kit.

The study was performed on 338 samples of which:

⇒ 47 positive samples to anti-dsDNA antibodies with the reference method

⇒ 291 negative samples to anti-dsDNA antibodies with the reference method

Results

		ELISA marketed Kit		
		+	-	
bmd DNA-LISA	+	45	14	Relative sensibility : 97.8%
	-	1	278	Relative specificity : 95.2% Accuracy : 95.6%

2. PRECISION

Estimated on three positive samples : strongly, moderate and weakly positive.

Intra-assay (10 tests in the same assay)		Inter-assays (5 tests in 4 different assays)	
Titre	CV (%)	Titre	CV (%)
320	2.0	350	5.0
86	5.0	108	11.0
48	6.0	51	11.0













REFERENCES

- AHMAN A et al. Molecular expression systems for anti-DNA antibodies - 1 – 2. Lupus 2002, 11, 824-832, 833-842.
- CONRAD K. et al. Autoantibodies – Diagnostic, pathogenic and prognostic relevance. Clin. and Exp. Rheumatol. 1997 ;15, 457-465
- HOLLINGSWORTH P.N. et al. Antinuclear antibodies In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, 1996, Amsterdam.74-90.
- HOMBURGER H.A. Cascade testing for autoantibodies in connective tissue disease. Mayo Clin. Proc., 1995, 70, 183-184.
- ISENBERG et al. Clinical laboratory assays for measuring anti-dsDNA antibodies. Were are we now? Lupus 2002, 11, 797-800.
- RAHMAN A et al. Anti-DNA antibodies – structure and function. Lupus 2002, 11, 776-779.
- RAVIRAJAN CT et al. An analysis of clinical disease activity and nephritis associated serum autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. Rheumatology 2001, 40, 1405-1412.
- SMEENK RJ et al. dsDNA autoantibodies. In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, 1996, Amsterdam.227-234

SUMMARY OF METHOD

	<i>AMOUNT TO BE DISTRIBUTED</i>	<i>REAGENTS</i>	<i>INCUBATION CONDITIONS</i>
INCUBATION OF SAMPLES	100µL	Dilution buffer (blank reagent)	30 mn room temperature
	100µL	Standards (in duplicate)	
	100µL	Diluted controls (in duplicate)	
	100µL	Diluted samples	
WASHING	Wash 3 times with dilution and washing buffer (300µL/well)		
⚠ Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess liquid.			
INCUBATION OF CONJUGATE	100µL	Anti-IgG-PEROX Ready to use	30 mn room temperature
WASHING	Wash 3 times with dilution and washing buffer (300µL/well)		
⚠ Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess liquid.			
ENZYME REACTION	100µL	Substrate solution ABTS	30 mn room temperature.
STOP REACTION	100µL	Stop Solution H ₂ SO ₄ (0.25M)	

SYMBOLS USED

	EC Declaration of conformity		Number of test
	ELISA Test		Consult Instructions
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Device		Manufactured by
	Catalogue number		Temperature limitation
	Lot Number		Biological risk
	Expiry Date		Reconstitute with

BioMédical Diagnostics SA

Office
Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tel : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com

