


FIDIS™ dsDNA

REF

MX 005

96

DEFINITION

Le coffret **FIDIS™ dsDNA** () constitue une méthode d'identification sur supports particulières utilisant un système de détection par cytométrie de flux. Il est destiné à la détection quantitative des autoanticorps dirigés contre l'**ADN double brin (dsDNA)**.

Les coffrets **FIDIS™ dsDNA** () peuvent être utilisés avec l'automate de dilution/répartition **CARIS™**.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les connectivites sont des maladies auto-immunes systémiques qui sont chacune principalement, dirigées contre un organe particulier et dont le classement repose sur des critères cliniques et biologiques. Leur diagnostic différentiel est ainsi grandement facilité par la mise en évidence des anticorps anti-nucléaires qui apparaissent souvent de façon précoce au cours de la maladie alors que la symptomatologie est encore incertaine.


Parmi ceux-ci, les anticorps anti-dsDNA sont considérés comme le marqueur sérologique majeur du LED. 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 LED.

La détection des anticorps anti-dsDNA est particulièrement utile à deux niveaux : en tant qu'aide au diagnostic du LED 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 nette entre les anti-dsDNA et l'activité de la maladie : les poussées lupiques sont généralement précédées d'une élévation du taux d'anticorps anti-dsDNA, 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-dsDNA et peuvent être adaptés par un suivi régulier de ces anticorps.

PRINCIPE DU TEST

FIDIS™ dsDNA () repose sur l'utilisation de microsphères de taille uniforme différemment colorées et d'un cytomètre de flux interfacé avec un système informatique de digitalisation et de traitement du signal. Une diode rouge du cytomètre de flux, en classant chaque catégorie de microsphères sur la base de sa fluorescence unique (du rouge à l'orange), permet l'identification du paramètre analysé. Parallèlement un laser excite la

fluorescence d'un composé secondaire pour quantifier la réaction spécifique qui y est associée.

Le coffret **FIDIS™ dsDNA** () permet de détecter les anticorps **anti-ADN double brin (dsDNA)**.

L'antigène nécessaire à la réalisation du test (antigène recombinant: **dsDNA**) est couplé à une catégorie de microsphères colorées, support de la réaction immunologique spécifique avec l'autoanticorps recherché.

Le test est réalisé dans une microplaque de filtration de 96 puits.

- Au cours d'une première étape, les échantillons dilués des patients à tester sont incubés en présence des microsphères sensibilisées par l'**antigène ADN double brin (dsDNA)**. Si l'échantillon contient l'anticorps recherché, celui-ci va se fixer à l'antigène correspondant.
- Après incubation, une étape de lavage par filtration permet d'éliminer les éléments non fixés.
- Un anticorps secondaire conjugué à la phycoérythrine dirigé contre les immunoglobulines humaines **d'isotype IgG** permet de révéler les anticorps précédemment capturés.
- Une étape finale de lavage stoppe la réaction et permet d'éliminer les anticorps conjugués non liés.
- La réaction est alors mesurée par le cytomètre de flux qui identifie le type de microsphères et mesure la fluorescence moyenne des conjugués fixés.
- Un système de calibration permet, par interpolation, de définir la valeur de l'échantillon en unité internationale (UI/ml).

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Pipettes de précision capables de délivrer précisément de 5µl à 1000 µl.
- Pipette multicanaux ou distributeur répétitif capables de délivrer précisément de 40µl à 300µl ou 5µl à 2 ml.
- Agitateur
- Chronomètre
- Sonicateur
- Papier absorbant
- Pipettes sérologiques
- Films pour microplaques

ÉCHANTILLONS

- Utiliser du sérum.
- Eviter d'utiliser des sérums lipémiques ou hémolysés, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus d'une fois.
- Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 5 jours maximum. Au-delà, ils devront être congelés à -20°C.
- 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.

COMPOSITION DU COFFRET

Plaquette de 96 micropuits à membrane filtrante munie d'un couvercle. MP	1 plaquette
Flacon (A) de microsphères colorées sensibilisées par l'antigène : dsDNA. <u>Lyophilisées</u> (à reconstituer avec le tampon D) MICROSPHERES	qsp 6ml
Flacon (B1) tampon de dilution des échantillons (flacon blanc) <u>Prêt à l'emploi</u> DIL SPE	2 x 115ml
Flacon de calibrateur* <u>Prêt à l'emploi</u> Le titre est indiqué sur l'étiquette du flacon. CAL	1 x 1,5ml
Flacon de contrôle positif donnant une réactivité standardisée et constituant un contrôle de réaction destiné à vérifier l'activité des réactifs et le bon fonctionnement de l'essai. <u>A diluer</u> Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon. CONTROL +	1 x 250µl
Flacon de contrôle négatif <u>A diluer</u> CONTROL -	1 x 250µl
Flacon de conjugué anti-IgG humaine couplé à la phycoérythrine. <u>Prêt à l'emploi</u> CONJ IgG	1 x 12ml
Flacon (C1) de tampon de lavage (flacon noir) <u>Prêt à l'emploi</u> BUF WASH	1 x 100ml
Flacon (D) de tampon de reconstitution des microsphères <u>Prêt à l'emploi</u> BUF MICROSPHERES	1 x 6ml

Le titre* du calibrateur (UI/ml) est standardisé par rapport à la référence internationale WHO : Wo/80.

STABILITE ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Remettre immédiatement entre +2°C et +8°C, les réactifs non utilisés.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Les réactifs en solutions 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.
- Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.
- Le coffret **FIDIS™ dsDNA** (bmd) 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.
- **FIDIS™ dsDNA** (bmd) 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.
- *Les contrôles et le calibrateur 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.*

PREPARATION DU TEST

Préparation de l'unité de filtration FIDIS™

☞ Vérifier les tuyaux reliant la pompe au support et le réglage du manomètre (molette totalement fermée).

Utilisation du système d'analyse FIDIS™ et du logiciel MLX-BOOSTER

☞ Se reporter au Manuel d'utilisation fourni avec le système **FIDIS™** pour effectuer les étapes de mise en route et de calcul. Pour toutes informations complémentaires et/ou résolution de problèmes, veuillez prendre contact auprès de bmd ou de votre distributeur.

1. Commencer la série comme indiquée dans le Manuel d'utilisation.
N.B : L'appareil met 30 minutes pour chauffer après l'avoir allumé. Un nouveau préchauffage est nécessaire après 4 heures d'inactivité du système.
2. Les étapes de calibration et de contrôles sont décrites dans le Manuel d'utilisation. Ces 2 étapes devront être exécutées régulièrement 1 fois/mois et à chaque nouveau lot de « Sheath fluid » afin d'assurer une performance optimale de l'appareil. L'étape de calibration doit également être effectuée si la température indiquée sur l'écran de la série du lot est en dehors de celle paramétrée.
3. Programmer un lot ou une série de lots multiples sur **FIDIS™** comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
4. Placer la microplaquette dans le support de plaques du système **FIDIS™** comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.

5. Effectuer l'analyse des résultats comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
6. A la fin de la dernière utilisation journalière de l'appareil, exécuter les opérations de lavage et de stérilisation avant d'arrêter le système d'analyse conformément aux instructions d'arrêt décrites dans le Manuel d'utilisation.

Préparation des réactifs

☞ Ramener l'ensemble des réactifs à **température ambiante** (+18°C/+25°C) avant de les préparer extemporanément.

1. Préparation des microsphères

- Reconstituer la solution de microsphère en ajoutant tout le flacon **D** de tampon de reconstitution des billes au flacon **A**. Attendre 5 minutes et vortexer.
- Durée de conservation après reprise : 2 mois entre +2°C et +8°C.

2. Préparation des échantillons et des contrôles

- Diluer les échantillons et les contrôles au **1/201** dans le tampon de dilution (**B1**).
Exemple : 10µl d'échantillon dans 2000µl de tampon de dilution (B1).
- **Agiter vigoureusement au vortex.**

3. Définition de la configuration du test

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

a. Prévoir systématiquement :

- ✗ 1 puits « blanc réactif »
- ✗ 1 puits pour le contrôle négatif
- ✗ 1 puits pour le contrôle positif
- ✗ 2 puits « calibrateur »

b. Détermination du nombre exact de puits nécessaires et de leur attribution

Les schémas qui suivent donnent 2 exemples de configuration selon le nombre de puits nécessaires et la disponibilité en puits vierges. Le sens du dépôt doit s'effectuer systématiquement par colonne sans intercaler de puits vides.

Une même plaque peut être utilisée au cours de différents essais si les puits non utilisés sont protégés par des films pour microplaque. Un même puits ne peut être réutilisé plusieurs fois.

Afin d'éviter toute erreur dans ce sens, il est conseillé d'identifier les puits déjà usagés (voir exemple 2 ci-dessous).

c. Programmation du protocole d'analyses au niveau du FIDIS™

☞ Se reporter au manuel d'utilisation FIDIS™ « Programmation d'un batch ou d'un Multibatch. ».

Exemple 1 :

- la plaque est totalement vierge : l'attribution des puits débute en A1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	E4	E12	E20								
B	Ctrl-	E5	E13	E21								
C	Ctrl+	E6	E14	E22								
D	Cal	E7	E15	E23								
E	Cal	E8	E16	E24								
F	E1	E9	E17	E25								
G	E2	E10	E18									
H	E3	E11	E19									

Exemple 2 :

- 16 puits ont déjà été utilisés : l'attribution des puits débute en A3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			Blanc	E4	E12	E20	E28	E36	E44	E52		
B			Ctrl-	E5	E13	E21	E29	E37	E45	E53		
C			Ctrl+	E6	E14	E22	E30	E38	E46			
D			Cal	E7	E15	E23	E31	E39	E47			
E			Cal	E8	E16	E24	E32	E40	E48			
F			E1	E9	E17	E25	E33	E41	E49			
G			E2	E10	E18	E26	E34	E42	E50			
H			E3	E11	E19	E27	E35	E43	E51			

MODE OPERATOIRE

1. Distribution des microsphères

- Protéger les puits non utilisés avec des films plastiques (si nécessaire).
- Déposer 50µl de microspheres dans chaque puits, **après avoir préalablement agité le flacon vigoureusement au vortex pendant 20s.**

REMARQUE :

- ☛ Dans le cadre de l'utilisation de l'automate CARIS™, une sonication des microsphères de 5 minutes est préconisée.
- ☛ Dans le cadre de l'utilisation d'un automate de dilution/répartition, les étapes 1 et 2 doivent être inversées :
⇒ distribuer le sérum dilué puis les microsphères

2. Incubation des échantillons

- Déposer 100µl de tampon de dilution (**B1**) pour le blanc réactif.
- Déposer 100µl de contrôles dilués, de calibrateur prêt à l'emploi et d'échantillons dilués.
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante sans agitation en recouvrant la plaque et en évitant de la laisser sous la lumière directe.

3. Lavage 1

Laver la plaque en utilisant l'unité de filtration par 2 cycles successifs en tampon de lavage (**C1**) :

- a. Retirer le couvercle de la microplaque et la positionner sur l'unité de filtration.
(vérifier que le robinet « casse vide » est en position fermée).
- b. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ». Réfermer le robinet « casse vide ».

- c. Distribuer 300µl de tampon de lavage (C1).
- d. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- e. Distribuer 300µl de tampon de lavage (C1).
- f. Déclencher la pompe.
Après aspiration totale du liquide, compter 5 secondes supplémentaires, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- g. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base 10 fois sur du papier absorbant.
- h. Repositionner la plaque sur le laveur et filtrer à nouveau 5 secondes. Arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
- i. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base sur un papier absorbant.
- j. Placer ensuite la microplaque sur une surface totalement sèche avant de distribuer le conjugué

4. Incubation du conjugué

- Déposer 100µl de conjugué
- Laisser incubé 30 minutes à température ambiante sans agitation, en recouvrant la plaque et en évitant de la placer sous la lumière directe. Le temps d'incubation débute après que le conjugué ait été ajouté à tous les puits. Si ce temps n'est pas respecté, les résultats pourront être erronés.

Remarque : le conjugué est sensible à la lumière
→ Refermer le flacon après utilisation.

5. Lavage 2

Laver la plaque en utilisant l'unité de filtration par 1 cycle en tampon de dilution (B1) :

Utiliser de préférence deux réservoirs à réactifs distincts pour les lavages 1 et 2.

Ou bien nettoyer et sécher correctement le réservoir entre les deux lavages afin de ne pas mélanger les deux tampons B1 et C1.

- a. Retirer le couvercle de la microplaque et la positionner sur l'unité de filtration. (vérifier que le robinet « casse vide » est en position fermée).
- b. Déclencher la pompe.
Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide par ouverture du robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- c. Distribuer 100µl de tampon de dilution (B1).
- d. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- e. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base sur un papier absorbant.

- f. Distribuer 100µl de tampon de dilution (B1) et procéder à l'analyse de la microplaque.

En cas de lecture différée, la plaque devra être analysée **dans l'heure qui suit l'ajout de la solution (B1)**. Durant cette période, la plaque doit être conservée à température ambiante et protégée de la lumière directe.

6. Analyse

☞ L'effectuer conformément au manuel d'utilisation **FIDIS™** et **MLX BOOSTER™**.

CRITERES DE VALIDATION DES RESULTATS

Le calibrateur, les contrôles positif et négatif doivent être testés dans chaque série d'essai pour s'assurer que tous les réactifs et procédures ont été exécutés correctement.

Afin de valider les résultats, tous les critères énumérés ci-dessous doivent être rencontrés. En cas de non-conformité d'un de ces critères, le test devra être considéré comme non valide et l'analyse devra être refaite.

- a. La valeur du contrôle positif doit être comprise dans les limites de celles indiquées sur les étiquettes des flacons correspondants.
- b. La valeur du contrôle négatif doit être inférieure à 30 UI/ml.

La solution de microspheres contient des billes témoins permettant de vérifier la présence de sérum dans les puits, ainsi que le bon déroulement du test. Un puits présentant un signal-réponse non conforme sera invalidé par le logiciel MLX BOOSTER™.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Unités arbitraires (UI/ml) pour le dsDNA	< 30 UI/ml	30 - 40 UI/ml	> 40 UI/ml
Interprétation	Négatif	Limite ^(*)	Positif

(*) Les résultats limites doivent être contrôlés sur un second prélèvement et interprétés en fonction d'examen complémentaires et du contexte clinique.

Chaque laboratoire doit établir et conserver ses propres valeurs de plage (normale) de référence, en fonction de la population de patients et d'autres facteurs locaux.

CALCUL DES RESULTATS

☞ Les résultats sont automatiquement calculés par le logiciel MLX-BOOSTER™ et peuvent être imprimés pour chaque analyse.

LIMITES

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

Les sérums de patients immunodéprimés donneront un résultat non valide

CONTROLE DE QUALITE

Il est conseillé d'utiliser des contrôles internes ou externes pour la spécificité dsDNA. Les contrôles multiparamétriques Immunotrol I et IV ([bmd](#), réf.: HM036 et HM051) renferment des anticorps humains dirigés contre le dsDNA. Ils sont à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

FIDIS™ dsDNA ([bmd](#)) constitue un réactif dérivé du coffret FIDIS™ Connective ([bmd](#)). Ils sont fabriqués selon le même procédé, notamment en ce qui concerne le mode de couplage des microsphères au dsDNA.

FIDIS™ dsDNA ([bmd](#)) est destiné au suivi spécifique des titres en auto-anticorps anti-dsDNA après la détection préalable d'un échantillon positif par FIDIS™ Connective.

Les valeurs d'interprétation sont identiques pour les deux coffrets.

SENSIBILITE, SPECIFICITE, CONCORDANCE PAR RAPPORT AUX AUTRES METHODES

FIDIS™ dsDNA ([bmd](#)) a été comparé à FIDIS™ Connective ([bmd](#)).

L'étude a porté sur 182 échantillons :

⇒ 54 échantillons associés à la présence de maladies systémiques auto-immunes

⇒ 128 échantillons provenant d'individus sains

Résultats

dsDNA		FIDIS™ Connective	
		Positifs	Négatifs
FIDIS™ dsDNA	Positifs	54	0
	Négatifs	0	128

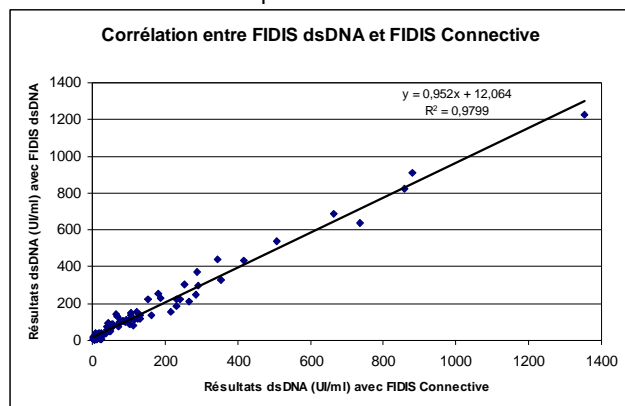
Sensibilité relative : 100%

Spécificité relative : 100%

Concordance : 100%

CORRELATION

L'analyse de la courbe de régression linéaire montre que les deux coffrets sont équivalents.



Fidélité du test

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

Intra-essai (10 tests dans le même essai)		Inter-essais (5 tests dans 5 essais différents)	
Valeur moyenne	CV (%)	Valeur moyenne	CV (%)
44	3.4	41	5.5
104	4.0	102	5.9
233	3.9	221	2.5

BIBLIOGRAPHIE

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.

RAHMAN A et al. Molecular expression systems for anti-DNA antibodies-1–2. Lupus 2002, 11, 824-832, 833-842.













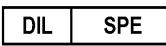

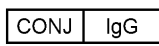
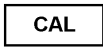
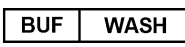
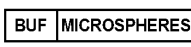



RAVIRAJAN CT et al. An analysis of clinical disease activity and nephritis associated serum autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. Rheumatology 2001, 40, 1405-1412.

SMEENK RJ et al. dsDNA autoantibodies. In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, 1996, Amsterdam.227-234.

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	QUANTITE A DISTRIBUER	REACTIFS	CONDITIONS D'INCUBATIONS
Déposer 50µl de microsphères dans chaque puits			
Incubation des échantillons	100µl	Tampon de dilution (B1): blanc réactif	30 min. Température ambiante
	100µl	Contrôle négatif dilué (1/201)	
	100µl	Contrôle positif dilué (1/201)	
	100µl	Calibrateur (en double)	
	100µl	Échantillons dilués (1/201)	
Lavage 1	Laver 2 fois au tampon de lavage (C1) (300µl/puits)		
Incubation du conjugué	100µl	Conjugué anti-IgG Prêt à l'emploi	30 min Température ambiante
Lavage 2	Laver 1 fois avec du tampon de dilution (B1) (100µl/puits)		
Lecture	Ajouter 100µl/puits de tampon de dilution (B1) et analyser par insertion de la plaque dans le cytomètre de flux. <i>En cas de lecture différée, la plaque devra être analysée dans l'heure qui suit l'ajout de la solution (B1). Durant cette période, la plaque doit être conservée à température ambiante et protégée de la lumière directe.</i>		

LEGENDE DES SYMBOLES

	Risque Biologique		Conservé à		Numéro de catalogue
	Lire le manuel d'utilisation		Pour le diagnostic in vitro uniquement		Numéro de lot
	Nombre de tests		A utiliser avant		Déclaration de conformité CE
	Microplaque		Contrôle négatif		Microsphères
	Diluant échantillon		Contrôle positif		Conjugué IgG
	Calibrateur		Tampon de lavage		Tampon de reconstitution des microsphères
	Test FIDIS		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



FIDIS™ dsDNA

REF **MX 005**



INTENDED USE

The **FIDIS™ dsDNA** ([bmd](#)) is a homogeneous fluorescent-based microparticles immunoassay using flow cytometry readings. It is designed for the quantitative detection of autoantibodies directed against **double stranded DNA (dsDNA)**.

The **FIDIS™ dsDNA** ([bmd](#)) kits can be used with a dispensing/diluting device, the **CARIS™ system**.

SUMMARY AND EXPLANATION

Connective diseases are systemic auto-immune diseases which are, most often, selectively directed against a specific organ. Their classification is based upon clinical and biological data. The detection of anti-nuclear antibodies, which often appears in the patient serum before any definite symptomatic signs, will allow the identification of the specific connective disease.

Among them, Anti-dsDNA antibodies are recognized as the major serologic marker of 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 clear-cut 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.

ASSAY PRINCIPLE

FIDIS™ dsDNA ([bmd](#)) kits are based on the use of distinct uniform size color-coded microspheres and a benchtop flow cytometer interfaced to digital signal processing hardware and software. A red diode laser beam in the flow cytometer classifies each set of microspheres on the basis of its unique fluorescence intensity (red to orange) thus identifying which analyte is being tested. At the same time, a green laser beam illuminates the external second molecule

fluorescence to quantify the reaction related to the specific analyte.

FIDIS™ dsDNA ([bmd](#)) kits allow the detection of **anti-dsDNA** antibodies.

The antigen, recombinant dsDNA, is covalently coupled to an individual set of microspheres through its surface functional groups.

The test is performed in a 96 well microplate with a filtering membrane at the bottom of the wells.

- In the first step, the sample is distributed in each well containing the microspheres mixture. If this sample contains the suspected antibodies, this antibody bind to the dsDNA antigen on the microspheres.
- After incubation, a wash step using a filtration process removes the unbound antibodies.
- A phycoerythrin labeled **anti-human IgG conjugate** is then added that binds to the previously bound antibodies.
- A final wash step allows to stop the reaction.
- The reaction is then directly measured by the flow cytometer, which differentiates each set of microspheres according to its fluorescence color while simultaneously measuring the average fluorescence emitted by the conjugate.
- A calibration system allows the determination of the titer (IU/mL) of each sample by interpolation.

ADDITIONAL MATERIAL – NOT SUPPLIED

- Precision pipettes capable of accurately delivering 5µL to 1000µL
- Multichannel Pipettes or dispensers capable of accurately delivering 40µL to 300µL or 5µL to 2 mL
- Vortex mixer
- Laboratory timer to monitor incubation steps
- Ultrasonic bath
- Absorbent towel
- Serological pipettes
- Microplate sealing films

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

- The test is performed on serum.
- Lipemic 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 5 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.

REAGENTS SUPPLIED

96 wells microplate with filtering membrane and lid. MP	1 plate
Vial (A) of color-coded microsphere set sensitized by dsDNA. <u>Lyophilized</u> (to be reconstituted with the buffer named D) MICROSPHERES	sq 6mL
Vial (B1) of sample dilution buffer (white vial) <u>Ready to use</u> DIL SPE	2 x 115mL
Vial of calibrator* <u>Ready to use</u> Cal <i>The titer is printed on the vial label</i>	1 x 1,5mL
Vial of positive control concentrated. This control has a standard reactivity, which provides evidence of the proper reagents activity and proper assay performance. <u>To be diluted</u> CONTROL + <i>Expected values are printed on the vial label.</i>	1 x 250 µL
Vial of negative control concentrate <u>To be diluted</u> CONTROL -	1 x 250µL
Vial of anti-human IgG coupled to phycoerythrin <u>Ready to use</u> CONJ IgG	1 x 12mL
Vial (C1) of washing buffer (black vial) <u>Ready to use</u> BUF WASH	1 x 100mL
Vial (D) of reconstitution buffer for the microsphere set <u>Ready to use</u> BUF MICROSPHERES	1 x 6mL

Calibrator titer for dsDNA (IU/ml) is standardized against the WHO international reference: Wo/80.

STABILITY AND STORAGE

- Store reagents in their original packaging at +2°C to +8°C.
- Do not freeze reagents.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- After use, store all components immediately back at +2°C to +8°C.

CAUTION

- Reagents in solution contain less of 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.
- Avoid to use reagents if signs of contamination or other visible changes occur
- The **FIDIS™ dsDNA** (cmd) kit has been developed according to CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC regarding classification, packaging and labelling of dangerous preparations.
- The **FIDIS™ dsDNA** kit (cmd) has been optimized for use as described in this procedure. Do not substitute other manufacturer reagents. Dilution or alteration of these reagents may also alter the performance of the test. Follow thoroughly the test procedure to insure optimal performance.
- *Calibrators and controls are from human origin. The human sera used in the preparation of these products were tested and found non-reactive for antibodies to HIV-1, HIV-2, anti-HCV and Hepatitis B antigen. Because no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, handle as if capable of transmitting infectious diseases.*

TEST SET-UP

FIDIS™ Washer

☞ Check the tubing connecting the pump to the stand and the manometer setting (wheel completely closed).

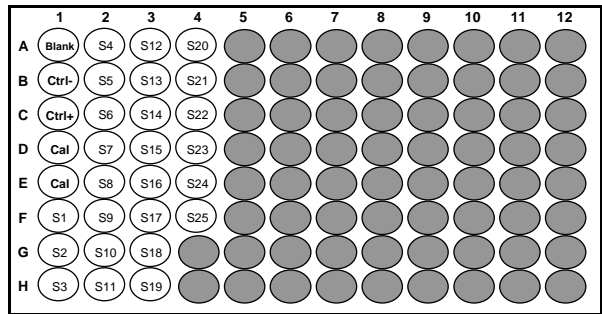
Using FIDIS™ Analyzer and MLX-BOOSTER Software

☞ See the User's Manual provided with the **FIDIS™ Instrument** for detailed instructions on running the equipment and for calculation. For additional information and/or trouble shooting problems, please contact cmd subsidiaries or distributors.

1. Start the run as described in the User's Manual.
NOTE: The FIDIS™ takes 30 minutes to warm up after being turned on. A new warm up is necessary after 4 hours of system inactivity.
2. Calibration and controls are described in the User's Manual. Calibration and controls should be routinely performed once per month and each time a new lot of Sheath fluid reagent is used in order to insure optimal instrument performance.
Calibration should also be performed when the temperature is out of the determined range shown on the run batch screen.
3. Programming a batch or a multibatch of test protocol on the FIDIS™.

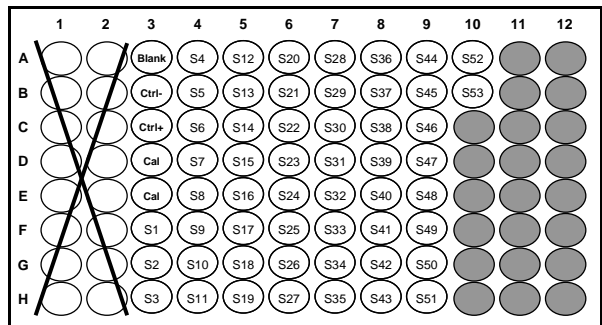
Example 1:

- The microplate is totally blank (no well has yet been used): Use A1 as the 1st well.



Example 2:

- 16 wells have already been used: Use A3 as the 1st well.



4. Load the microplate into the plate holder of the FIDIS™ as described in the User’s Manual.
5. Analyze the results according to the User’s Manual.
6. When finished for the day, perform the sanitizing and soak operations, prior to turning the Analyzer off according to the shutting down procedure described in the User’s Manual.

Reagents Preparation

☞ Remove the individual components from storage, allow them to warm up to **room temperature** (+18°C to +25°C), and mix them well.

1. Microsphere preparation

- Reconstitute the microsphere solution by adding the vial **D** of reconstitution buffer to the vial **A** of lyophilized microspheres. Wait 5 minutes and vortex.
- Stable 2 months at +2°C to +8°C, after reconstitution.

2. Preparation of samples and controls.

- Dilute the samples and controls at **1:201** in dilution buffer (**B1**).
Ex.: 10µL sample in 2000µL dilution buffer (**B1**).
- **Vortex vigorously.**

3. Assay configuration

Use the work-sheet included in the kit to identify the location of the samples.

a. When setting up the test, systematically take into account the following well requirements: ⇒ See examples below

- ✗ 1 “reagent-blank” well
- ✗ 1 well for negative control
- ✗ 1 well for positive control
- ✗ 2 “calibrator” wells

b. Calculation of the correct number of wells necessary and their location.

In the following examples, 2 different configurations are described, according to the number of wells needed, and the availability of unused wells. The sample dispensing must be systematically carried out in a column. Do not leave empty wells.

The same microplate can be used for more than one serie of tests if unused wells are protected by microplate sealing film. Any single well can only be used once.

To avoid any error in using a well more than once, identify the used wells with a marker (see example 2 below).

c. Programming of the test protocol on the FIDIS™

☞ Refer to the FIDIS™ user’s manual: “Creating a batch or a multi-batch”.

ASSAY PROCEDURE

1. Microspheres dispensing

- Before to start the assay and if it is necessary, protect the unused wells with a microplate sealing film.
- **Vortex the microspheres reagent vigorously for 20s** and dispense 50µL in each well to be used.

PLEASE NOTE:

- If CARIS™ is used, the microspheres should be sonicated for 5 minutes.
- If a dispensing/diluting device is used (like CARIS™), the procedure steps 1 and 2 should be reversed:
⇒ dispense diluted sera in first and then, dispense microspheres.

2. Addition and Incubation of the samples

- Dispense 100µL of sample dilution buffer (**B1**) for reagent blank.
- Dispense 100µL of prediluted controls, of ready to use calibrator and of prediluted samples.
- Cover the plate and incubate 30 minutes at room temperature, away from direct sunlight and without shaking.

3. Wash step 1

Wash the plate 2 times with washing buffer (**C1**) using filtration unit:

- a. Remove the microplate lid (verify if the vacuum break valve is closed) and place it on the washer.
- b. Start the pump. Stop it when the whole incubation liquid has been removed in totality and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.

- c. Dispense 300µL of washing buffer **(C1)** in all the used wells.
- d. Start the pump. Stop it when the whole buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- e. Dispense 300µL of washing buffer **(C1)** in all the used wells.
- f. Start the pump. Stop it after 5 additional seconds when all the buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- g. Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by tapping vigorously the plate 10 times on an absorbent towel.
- h. Place again the microplate on the washer and start the pump for 5 seconds. Stop it and quickly open the vacuum break valve.
- i. Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by blotting vigorously the plate on an absorbent towel.
- j. Place the plate on a totally dry surface before starting the conjugate incubation.

4. Incubation of the conjugate

- Dispense 100µL of ready to use conjugate in each well used.
- Cover the plate and incubate 30 minutes at room temperature away from direct sunlight and without shaking. The incubation time starts after the conjugate has been added to all wells. If this timing is not followed, the results might be erroneous.

Note : the conjugate is photosensitive.
 ⇒ After using, close the vial carefully.

5. Wash step 2

Wash the plate using the filtration unit on 1 cycle with dilution buffer **(B1)**.

Use two different reagent reservoirs for the 2 washing steps. Either clean and dry correctly the reservoir between both wash steps (avoid to mix both B1 and C1 buffers).

- a. Remove the microplate lid (verify that the vacuum break valve is closed) and place it on the washer.
- b. Start the pump. Stop it when the whole incubation liquid has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- c. Dispense 100µL of dilution buffer **(B1)** in all the used wells.
- d. Start the pump. Stop it when the whole buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- e. Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by blotting the plate on an absorbent towel.

- f. Dispense 100µL of dilution buffer **(B1)** in all the used wells. Place the plate on a totally dry surface at room temperature.

The reading must be doing in the hour following adding the solution (B1). During this time, keep the plate at room temperature away from direct sunlight.

6. Reading of the test

☞ Follow the **MLX-BOOSTER™** and **FIDIS™** user's manual: Processing batches.

VALIDATION CRITERIA OF THE RESULTS

Calibrator, negative and positive controls have to be run with every batch of samples to ensure that all reagents and procedures performed properly.

In order to validate the results, all the criteria listed below must be met. Otherwise, the test is invalid and must be repeated.

- a. The positive controls should show a value within the limits printed on the corresponding vial labels.
- b. The negative controls should be less than 30 IU/mL.

The microsphere set contains Internal standard beads allowing to verify the presence of serum in wells, as well as the good respect of the test procedure. Wells presenting a not corresponding fluorescent signal will be no valid with MLX BOOSTER™ software.

INTERPRETATION OF RESULTS

International Units (IU/ml) for the dsDNA	< 30 IU/mL	30 – 40 IU/mL	> 40 IU/mL
Interpretation	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.*

Each laboratory should establish and maintain its own references (normal) range values, based on the patient population and other local factors.

CALCUL OF RESULTS

☞ The results are automatically calculated by MLX-BOOSTER™ software and can be printed for each assay.

LIMITATION

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.

The serums from Immunodeficient patients will give a no valid result.

QUALITY CONTROL

It is recommended to use internally and externally sourced control material for the different specificities. Immunotrol I and IV multiparametric controls ([bmd](#), Cat. n° HM036 and HM051) contain human auto-antibodies directed against dsDNA specificity. To be assayed in the same manner as the unknown samples.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCES OF THE TEST

FIDIS™ dsDNA ([bmd](#)) is a derived product from FIDIS™ Connective ([bmd](#)). These two kits are manufactured under the same process, particularly for coupling procedure of microspheres to dsDNA.

FIDIS™ dsDNA ([bmd](#)) is designed for the specific follow-up of anti-dsDNA autoantibodies levels after detection of a positive sample by FIDIS™ Connective. Interpretation values are equal for the two kits.

INDICATION OF THE DIAGNOSTIC VALUE IN COMPARISON WITH OTHER METHODS

FIDIS™ dsDNA kit ([bmd](#)) has been compared to FIDIS Connective kit ([bmd](#)):

The study was performed on 182 samples :

- 54 samples related to systemic autoimmune diseases
- 128 samples from blood donors

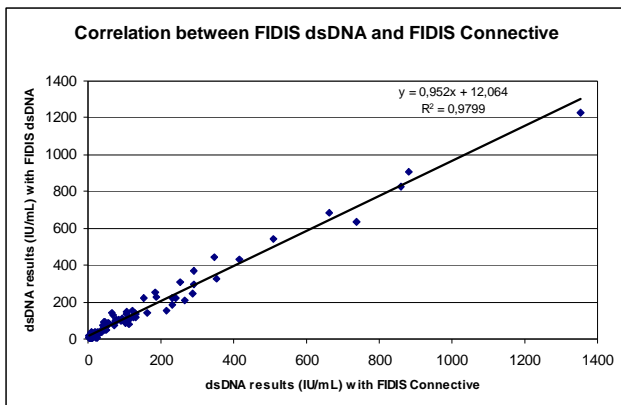
Results

dsDNA		FIDIS™ Connective	
		Positive	Negative
FIDIS™ dsDNA	Positive	54	0
	Negative	0	128

Relative sensitivity : 100%
 Relative specificity : 100%
 Concordance : 100%

CORRELATION

The linear regression analysis of the two products showed that both are equivalent.



Reproducibility

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

Within-run (10 tests in the same run)		Between-run (5 tests in 5 different runs)	
Mean value	CV (%)	Mean value	CV (%)
44	3.4	41	5.5
104	4.0	102	5.9
233	3.9	221	2.5

BIBLIOGRAPHY

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.

AHMAN A et al. Molecular expression systems for anti-DNA antibodies - 1 – 2. Lupus 2002, 11, 824-832, 833-842.













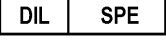

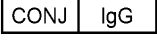

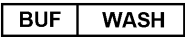
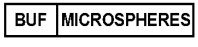

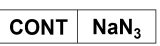

RAVIRAJAN CT et al. An analysis of clinical disease activity and nephritis associated serum autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. Rheumatology 2001, 40, 1405-1412.

SMEENK RJ et al. dsDNA autoantibodies. In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, 1996, Amsterdam.227-234.

SUMMARY OF THE TEST PROCEDURE

	VOLUME TO BE DISTRIBUTED	REAGENTS	INCUBATION CONDITIONS
Dispense 50µL of microspheres reagent in each well to be used			
Incubation of the samples	100µL	Dilution buffer (B1) : Reagent blank	30 min. Room temperature
	100µL	Diluted negative control (1:201)	
	100µL	Diluted positive control (1:201)	
	100µL	Calibrator (in duplicate)	
	100µL	Diluted samples (1:201)	
Washing 1	Wash twice in washing buffer (C1) (300µL/well)		
Incubation of the conjugate	100µL	Ready to use Anti-IgG conjugate	30 min Room temperature
Washing 2	Wash 1 time in Dilution buffer (B1) (100µL/well)		
Reading	<p>Add 100µL/well of Dilution buffer (B1) and proceed immediately with the reading in FIDIS™ Instrument</p> <p>The reading must be doing in the hour following adding the solution (B1). During this time, keep the plate at room temperature away from direct sunlight.</p>		

SYMBOLS USED

	Biological risk		Temperature limitation		Catalog Number
	Read instructions for use		In Vitro Diagnostic Use		Lot Number
	Number of tests		Use by		EC Declaration of Conformity
	Microplate		Negative control		Microspheres
	Specimen diluent		Positive control		IgG Conjugate
	Calibrator		Wash Buffer		Microsphere reconstitution buffer
	FIDIS test		Contains sodium azide		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

