

## Scleroderma Profile 12 IgG Dot

Code: AD SCLERO12D

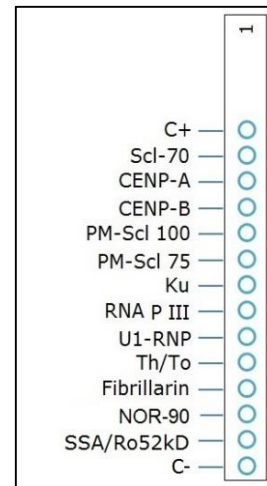
Pour Diagnostic in vitro

### 1 INDICATIONS D'UTILISATION

La trousse ALPHADIA Scleroderma Profile 12 IgG Dot contient 24 tests Immunodot permettant la détection des auto-anticorps IgG dirigés contre les antigènes Scl-70, CENP-A, CENP-B, PM-Scl 100, PM-Scl 75, Ku, RNA Polymérase III, U1-RNP, Th/To, Fibrillarine, NOR90 et SSA/Ro 52kD dans le sérum humain.

### 2 PRINCIPE DU TEST

Le test est basé sur une méthode immunoenzymatique. Les bandelettes sont composées d'une membrane fixée sur un support plastique. Dans la procédure de dosage, les bandelettes sont incubées avec le sérum du patient dilué au 1/151. Les anticorps, s'ils sont présents dans l'échantillon, se lient à l'antigène spécifique sur la membrane. La fraction non liée est éliminée par lavage dans l'étape suivante. Ensuite les immunoglobulines anti-IgG humaines conjuguées à de la phosphatase alcaline sont mises en incubation avec les bandelettes et se lient aux complexes antigènes-anticorps sur la surface de la membrane. Après une seconde étape de lavage permettant d'éliminer l'excès de conjugué, la solution de chromogène/substrat est ajoutée et provoque l'apparition d'un produit insoluble coloré (violet) qui précipite sur le site de la réaction enzymatique. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon.



### 3 CONTENU DE LA TROUSSE

**Avant toute utilisation de la trousse, assurez-vous que tous les articles mentionnés s'y trouvent.**

**Ne pas utiliser cette trousse si elle est incomplète ou endommagée. Dans ce cas, merci de contacter votre distributeur.**

Abréviations par ordre alphabétique:

AP = Phosphatase alcaline; BCIP = Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphate; BSA = Albumine de sérum bovin; KCl = Chlorure de potassium; MgCl<sub>2</sub> = Chlorure de magnésium; MIT = MethylIsoThiazolone (conservateur); NaCl = Chlorure de sodium; NaN<sub>3</sub>: Sodium azide; NBT = NitroBlue Tetrazolium; TBS = Tampon Tris Salin.

<b>A RECONSTITUER:</b>	<b>Tampon de lavage (10 x)</b>	<b>1 x 40 ml – concentré x 10</b> (incolore) <i>Contient: H<sub>2</sub>O • TBS • NaCl • Tween • MIT</i>
<b>PRETS A L'EMPLOI:</b>	<b>Bandelettes</b>	<b>24 unités</b> <i>14 Dots chacune:</i> <i>1 contrôle négatif (C-)</i> <i>12 antigènes</i> <i>1 contrôle positif (C+)</i>
	<b>Diluant pour échantillon</b>	<b>1 x 40 ml</b> (jaune) <i>Contient: H<sub>2</sub>O • TBS • NaCl • Tween • BSA • MIT • colorant</i>
	<b>Conjugué</b>	<b>1 x 40 ml</b> (rouge) <i>Contient: H<sub>2</sub>O • TBS • NaCl • KCl • MgCl<sub>2</sub> • immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines/AP • MIT • colorant</i>
	<b>Substrat</b>	<b>1 x 40 ml</b> (bouteille brune, solution jaune clair) <i>Contient: H<sub>2</sub>O • NaN<sub>3</sub> (0.05 %) • MgCl<sub>2</sub> • TBS • NBT • BCIP • stabilisateur NBT</i>
	<b>Plaque d'incubation</b>	<b>3 unités</b> <i>8 puits d'incubation par plaque</i>

### 4. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

Agitateur/ Micropipettes / Chronomètre / éprouvette graduée / eau distillée ou déionisée / pinces / papier absorbant.

### 5. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Une fois reconstituée, la solution de lavage est conservée pendant au moins un mois à 2-8°C.

Conserver tous les réactifs et les bandelettes à 2-8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de chaque flacon ou tube. Les bandelettes non utilisées doivent être remises dans leur tube et conservées à 2-8°C.

## 6. PRECAUTIONS D'UTILISATION

Cette trousse est destinée uniquement au diagnostic in vitro. La trousse contient des composants pouvant présenter des risques. Eviter le contact avec les yeux et la peau. Les échantillons de patients devraient être manipulés comme s'ils étaient capables de transmettre des maladies infectieuses.

Ne pas mélanger ou remplacer les réactifs ou les bandelettes provenant de lots différents. Eviter de toucher les bandelettes avec les doigts. Utiliser des pinces ou des gants de laboratoire. Amener tous les réactifs à température ambiante (18-24°C), avant utilisation. Respecter strictement les temps d'incubation. Manipuler la solution de chromogène / substrat (NBT/BCIP) avec précaution afin d'éviter toute contamination avec de la phosphatase alcaline.

## 7. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS, MANIPULATION ET CONSERVATION

Le test doit être utilisé de préférence sur des échantillons récemment prélevés.

Les sérums présentant des particules devraient être centrifugés à faible vitesse.

Les échantillons de sang doivent être recueillis dans des tubes secs ou dans des tubes contenant de l'EDTA ou de l'héparine. Après séparation, les échantillons sériques doivent être utilisés immédiatement ou aliquotés et conservés à 2-8°C pendant deux ou trois jours ou congelés à -20°C pour de plus longues périodes. Eviter les congélations décongélations répétées des échantillons.

## 8. PROCEDURE DE DOSAGE

### INDICATIONS PRELIMINAIRES

Les dots sont précolorés en bleu sur les bandelettes; ceci garantit que tous les antigènes ont été correctement adsorbés sur la membrane. Cette coloration bleue disparaît pendant la première étape de la procédure; la membrane devient alors légèrement rose; cette coloration disparaît à la fin de la procédure.

Pendant la procédure, il est nécessaire d'agiter la plaque d'incubation pour garantir une circulation efficace des liquides sur la membrane. On peut utiliser tout agitateur dont l'amplitude et/ou la vitesse du mouvement ne cause pas d'éclaboussures des solutions et des contaminations entre les puits. Une vitesse d'agitation comprise entre 10 et 60 rpm (rotations par minute) est idéale. Si le mouvement de l'agitateur peut être réglé, il est préférable (mais non indispensable) d'utiliser une agitation légère durant les étapes d'incubation et une agitation plus forte durant les étapes de lavage.

Après le remplissage des puits avec la solution, agiter manuellement la plaque d'incubation pour que les bandelettes soient complètement immergées et pour éliminer les bulles d'air qui pourraient être coincées sous les bandelettes. Les bandelettes qui flottent, doivent être poussées dans la solution (avec des pinces ou l'embout d'une pipette appliqués sur la zone plastique d'identification).

Eviter de toucher, avec les doigts, les pinces ou l'embout de pipette, la membrane sur la bandelette. Utiliser toujours la zone plastique d'identification pour la manipulation. Toute la procédure doit être effectuée à température ambiante.

### 8.1 Préparation des réactifs

1. Amener tous les réactifs à température ambiante (18-24°C) avant utilisation.
2. Diluer le tampon de lavage concentré 10x avec de l'eau distillée.

*Préparer 15 ml de tampon de lavage par bandelette utilisée.*

*Exemple : 1,5 ml de tampon de lavage concentré + 13,5 ml d'eau distillée pour une bandelette.*

### 8.2 Schéma de pipettage

1. **Placer une bandelette par patient dans chaque puits** avec la face réactive au-dessus.
2. Ajouter **2 ml de solution de lavage** dans chaque puits. Incuber pendant 10 min sur agitateur  
*La coloration bleue des Dots disparaît complètement si les bandelettes sont correctement immergées. Si ce n'est pas le cas, prolonger l'incubation jusqu'à la disparition complète de la coloration bleue.*
3. **Eliminer** la solution contenue dans les puits.  
*Enlever le liquide des puits en retournant doucement la plaque. Les bandelettes adhèrent au fond des puits. Appliquer le bord de la plaque d'incubation sur du papier absorbant.*
4. Ajouter **1,5 ml de diluant pour échantillon** par puits.
5. Ajouter **10 µl d'échantillon** de sérum de patient dans chaque puits. **Incuber 30 minutes** sur l'agitateur.  
*Eviter de toucher la membrane avec l'embout de la pipette. Déposer l'échantillon dans la solution, de préférence sur la partie supérieure de la bandelette (sur la zone plastique d'identification).*  
**Note** : Les étapes 4 et 5 peuvent être combinées en pré diluant les échantillons dans des tubes en verre ou en plastique (1,5 ml de diluant + 10 µl d'échantillon → Mélanger → verser dans le puits)
6. **Eliminer** la solution contenue dans les puits.  
*Enlever le liquide des puits en retournant doucement la plaque. Les bandelettes adhèrent au fond des puits. Appliquer le bord de la plaque d'incubation sur du papier absorbant.*
7. **Laver 3 x 3 minutes** avec **1,5 ml de tampon de lavage** dans chaque puits (sur agitateur).  
*Après chaque étape de lavage, enlever le liquide des puits en retournant doucement la plaque. Les bandelettes adhèrent au fond des puits. Appliquer le bord de la plaque d'incubation sur du papier absorbant*
8. Ajouter **1,5 ml de conjugué** dans chaque puits. **Incuber 30 minutes** sur agitateur.
9. **Eliminer** la solution contenue dans les puits  
*Enlever le liquide des puits en retournant doucement la plaque. Les bandelettes adhèrent au fond des puits. Appliquer le bord de la plaque d'incubation sur du papier absorbant*

10. **Laver 3 x 3 minutes** avec **1,5 ml de tampon de lavage** dans chaque puits (sur agitateur).  
*Après chaque étape de lavage, enlever le liquide des puits en renversant doucement la plaque. Les bandelettes adhèrent au fond des puits. Appliquer le bord de la plaque d'incubation sur du papier absorbant*
11. Ajouter **1,5 ml de substrat** dans chaque puits. **Incuber 10 minutes** sur agitateur.
12. **Éliminer** la solution contenue dans les puits  
*Enlever le liquide des puits en retournant doucement la plaque. Les bandelettes adhèrent au fond des puits. Appliquer le bord de la plaque d'incubation sur du papier absorbant*
13. **Laver 1 x 3 minutes** avec **1,5 ml de tampon de lavage** dans chaque puits pour arrêter la réaction.
14. **Retirer** les bandelettes des puits et les laisser sécher sur du papier absorbant pendant 30 minutes. L'interprétation doit être faite dans les 24 heures qui suivent la réalisation du test.

## 9. INTERPRÉTATION DES RESULTATS

**A IMPORTANT : La positivité de tous les paramètres de cette trousse n'est pas possible, et un tel résultat n'est pas valide. Un test supplémentaire doit être effectué pour établir le diagnostic.**

1. Enlever l'adhésif derrière chaque bandelette et les coller comme représenté dans le dessin sur la feuille d'interprétation des résultats fournie avec la trousse. Celui-ci indiquera les positions respectives des différents contrôles et antigènes sur la membrane.
2. Le Dot supérieur (contrôle positif) doit toujours être positif pour tous les échantillons.  
*La coloration de ce contrôle positif garantit que le test a été réalisé correctement et que les composants de la trousse ne sont pas dégradés.*
3. Comparer les Dots antigènes avec le contrôle négatif toujours situé en dernière position.  
*L'intensité de la couleur des Dots antigènes est directement proportionnelle à la concentration de l'anticorps spécifique dans l'échantillon du patient.*

*Dans des conditions optimales, et si l'échantillon est dépourvu de substances interférentes, le contrôle négatif est presque incolore. Au contraire, un contrôle négatif plus coloré indique un taux important de liaisons non spécifiques dans l'échantillon.*

### RESULTAT POSITIF :

Un échantillon est positif pour un anticorps spécifique si l'intensité de la couleur du Dot antigène correspondant est supérieure à l'intensité de la couleur du Dot Contrôle Négatif.

### RESULTAT NEGATIF :

Un échantillon est négatif pour un anticorps spécifique si l'intensité de la couleur du Dot antigène correspondant est inférieure ou égale à l'intensité de la couleur du Dot Contrôle Négatif.

Note: Une interprétation visuelle peut être difficile pour les dots antigènes dont l'intensité de coloration est très faible et très proche de l'intensité du Contrôle Négatif. Dans de tels cas, l'utilisation du système Dr DOT/BlueScan peut être avantageuse et permettre une interprétation plus précise.

Unités arbitraires Dr DOT (AU)	Interprétation
< 5	négatif
5 - 10	équivoque (*)
>10	positif

\* Des faibles concentrations d'auto-anticorps peuvent être observées chez des patients sains. Pour cette raison, un résultat positif faible (entre 5 et 10 UA), bien que valide, doit être considéré comme équivoque. Dans un tel cas, il est recommandé de réaliser un nouveau test du patient, de préférence en utilisant un nouvel échantillon. Si le résultat reste équivoque après ce nouveau test, d'autres tests de diagnostic et / ou clinique doivent être utilisés pour aider à déterminer le statut auto-immun du patient.

## 10. PERFORMANCES

### 10.1 Reproductibilité

Des échantillons de référence ont été testés pour chaque anticorps dans des séries successives statistiquement représentatives tant dans un même essai que lors de différents essais afin de calculer respectivement la variation intra et inter essais. Dans tous les cas, les variations d'intensité de coloration des dots se trouvaient dans les limites attendues et l'écart type était inférieur à 15 %. *Les données détaillées sont disponibles sur demande.*

### 10.2 Sensibilité et spécificité

Des échantillons de référence caractérisés (échantillons confirmés positifs ou négatifs pour certains anticorps spécifiques et ce par des laboratoires de référence et/ou des méthodes de référence) ont été testés en suivant les instructions du test

La sensibilité et la spécificité ont été calculées à partir des résultats générés par le logiciel Dr DOT.

<p><b>Sci-70</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>+</th> <td>vrai positif 13</td> <td>faux positif 0</td> </tr> <tr> <th>-</th> <td>faux négatif 0</td> <td>vrai négatif 91</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensibilité 100% Spécificité 100%</p>		+	-	+	vrai positif 13	faux positif 0	-	faux négatif 0	vrai négatif 91	<p><b>CENP-A</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>+</th> <td>vrai positif /</td> <td>faux positif /</td> </tr> <tr> <th>-</th> <td>faux négatif /</td> <td>vrai négatif /</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensibilité - % Spécificité - % Pas de méthode de référence !</p>		+	-	+	vrai positif /	faux positif /	-	faux négatif /	vrai négatif /	<p><b>CENP-B</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>+</th> <td>true positive 16</td> <td>false positive 1</td> </tr> <tr> <th>-</th> <td>false negative 0</td> <td>true negative 97</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitivity 100% Specificity 99%</p>		+	-	+	true positive 16	false positive 1	-	false negative 0	true negative 97	<p><b>PM-Sci 100</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>+</th> <td>vrai positif 10</td> <td>faux positif 0</td> </tr> <tr> <th>-</th> <td>faux négatif 0</td> <td>vrai négatif 24</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensibilité 100% Spécificité 100%</p>		+	-	+	vrai positif 10	faux positif 0	-	faux négatif 0	vrai négatif 24
	+	-																																					
+	vrai positif 13	faux positif 0																																					
-	faux négatif 0	vrai négatif 91																																					
	+	-																																					
+	vrai positif /	faux positif /																																					
-	faux négatif /	vrai négatif /																																					
	+	-																																					
+	true positive 16	false positive 1																																					
-	false negative 0	true negative 97																																					
	+	-																																					
+	vrai positif 10	faux positif 0																																					
-	faux négatif 0	vrai négatif 24																																					
<p><b>PM-Sci 75</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>+</th> <td>vrai positif /</td> <td>faux positif /</td> </tr> <tr> <th>-</th> <td>faux négatif /</td> <td>vrai négatif /</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensibilité - % Spécificité - % Pas de méthode de référence !</p>		+	-	+	vrai positif /	faux positif /	-	faux négatif /	vrai négatif /	<p><b>Ku</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>+</th> <td>vrai positif 22</td> <td>faux positif 0</td> </tr> <tr> <th>-</th> <td>faux négatif 0</td> <td>vrai négatif 50</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensibilité 100% Spécificité 100%</p>		+	-	+	vrai positif 22	faux positif 0	-	faux négatif 0	vrai négatif 50	<p><b>RNA-Polymerase III</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>+</th> <td>vrai positif 4</td> <td>faux positif 0</td> </tr> <tr> <th>-</th> <td>faux négatif 0</td> <td>vrai négatif 264</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensibilité - % Spécificité - %</p>		+	-	+	vrai positif 4	faux positif 0	-	faux négatif 0	vrai négatif 264	<p><b>U1-RNP</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>+</th> <td>vrai positif 43</td> <td>faux positif 2</td> </tr> <tr> <th>-</th> <td>faux négatif 0</td> <td>vrai négatif 93</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensibilité 100 % Spécificité 98 %</p>		+	-	+	vrai positif 43	faux positif 2	-	faux négatif 0	vrai négatif 93
	+	-																																					
+	vrai positif /	faux positif /																																					
-	faux négatif /	vrai négatif /																																					
	+	-																																					
+	vrai positif 22	faux positif 0																																					
-	faux négatif 0	vrai négatif 50																																					
	+	-																																					
+	vrai positif 4	faux positif 0																																					
-	faux négatif 0	vrai négatif 264																																					
	+	-																																					
+	vrai positif 43	faux positif 2																																					
-	faux négatif 0	vrai négatif 93																																					
<p><b>Th/To</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>+</th> <td>vrai positif /</td> <td>faux positif /</td> </tr> <tr> <th>-</th> <td>faux négatif /</td> <td>vrai négatif /</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensibilité - % Spécificité - % Pas de méthode de référence !</p>		+	-	+	vrai positif /	faux positif /	-	faux négatif /	vrai négatif /	<p><b>Fibrillarín</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>+</th> <td>vrai positif /</td> <td>faux positif /</td> </tr> <tr> <th>-</th> <td>faux négatif /</td> <td>vrai négatif /</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensibilité - % Spécificité - % Pas de méthode de référence !</p>		+	-	+	vrai positif /	faux positif /	-	faux négatif /	vrai négatif /	<p><b>NOR-90</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>+</th> <td>vrai positif /</td> <td>faux positif /</td> </tr> <tr> <th>-</th> <td>faux négatif /</td> <td>vrai négatif /</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensibilité - % Spécificité - % Pas de méthode de référence !</p>		+	-	+	vrai positif /	faux positif /	-	faux négatif /	vrai négatif /	<p><b>SSA/Ro52kD</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>+</th> <td>vrai positif /</td> <td>faux positif /</td> </tr> <tr> <th>-</th> <td>faux négatif /</td> <td>vrai négatif /</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensibilité - % Spécificité - % Pas de méthode de référence !</p>		+	-	+	vrai positif /	faux positif /	-	faux négatif /	vrai négatif /
	+	-																																					
+	vrai positif /	faux positif /																																					
-	faux négatif /	vrai négatif /																																					
	+	-																																					
+	vrai positif /	faux positif /																																					
-	faux négatif /	vrai négatif /																																					
	+	-																																					
+	vrai positif /	faux positif /																																					
-	faux négatif /	vrai négatif /																																					
	+	-																																					
+	vrai positif /	faux positif /																																					
-	faux négatif /	vrai négatif /																																					

Note: Pour l'antigène **en gris**, comme aucun échantillon clairement caractérisé n'est disponible et/ou comme il n'existe pas de méthode de référence, aucune valeur ne peut raisonnablement être donnée

## 11. LIMITES DU TEST

- Le diagnostic ne doit pas être établi uniquement sur base d'une seule méthode de test.
- Les résultats doivent être toujours interprétés en tenant compte de l'examen clinique, de l'historique du patient et des résultats obtenus au moyen d'autres méthodes. Aucune technique utilisée seule ne peut écarter la possibilité de résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Dans cette optique, un test d'immunofluorescence indirecte devrait, dans la mesure du possible, être réalisé en parallèle à la détermination des auto-anticorps faite avec les trousse dots pour BlueDiver Instrument. L'immunofluorescence étant reconnue comme méthode de référence en auto-immunité.
- Alphadia s.a./n.v. et ses distributeurs autorisés ne peuvent pas être tenus responsables des dommages occasionnés indirectement ou consécutivement à un changement ou une modification dans le procédé indiqué, à une utilisation abusive de la trousse et/ou à l'utilisation d'une trousse incomplète ou endommagée. L'utilisation de cette trousse est réservée uniquement à un personnel technique qualifié.
- L'utilisation de cette trousse est soumise au respect des Bonnes Pratiques de Laboratoires « BPL » et doit également tenir compte de tous les règlements généraux et spécifiques liés à l'utilisation d'une telle trousse.
- La responsabilité de Alphadia s.a./n.v. se limite dans tous les cas au remplacement de la trousse.

## 12. DÉPANNAGE

<b>Pas d'apparition de réaction</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation du tampon de lavage concentrée en lieu et place de la solution diluée</li> <li>- Echantillons trop dilués</li> <li>- Dilution du conjugué ; pour rappel, le conjugué est prêt à l'emploi</li> <li>- Conjugué inactif</li> </ul>
<b>Bruit de fond trop élevé</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mauvaise qualité de l'échantillon (particules, vieux sérum, contamination bactérienne)</li> <li>- L'étape de pré-lavage a été insuffisante ou omise</li> <li>- Faible qualité du lavage</li> <li>- Incubation trop longue</li> <li>- Incubation à des températures trop élevées</li> <li>- Mauvaise dilution des échantillons</li> <li>- Contamination du NBT</li> </ul>