

M2 native (nPDC) IgG

Référence: M2NAT-24

Antigen Chip

Protocole BlueDiver: 02

Référence BlueDiver Combi: **031**

1 INDICATIONS D'UTILISATION

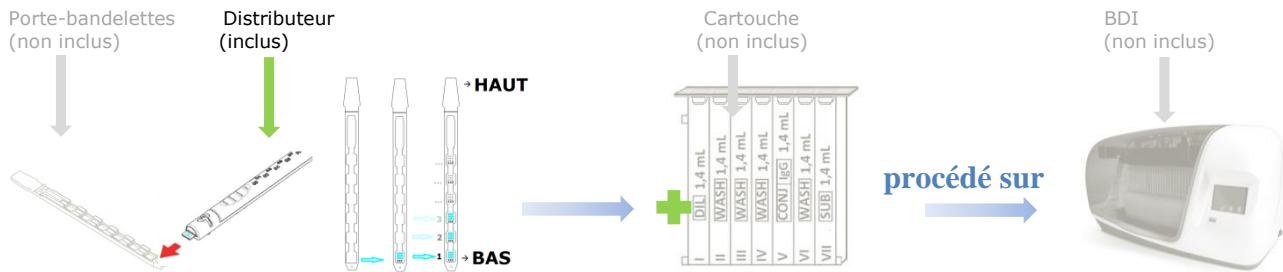
Le système BlueDiver Combi de D-tek permet à l'utilisateur l'assemblage à façon de différentes pastilles d'antigènes en une seule bandelette de test. Le BlueDiver Combi M2 native (nPDC) IgG fait partie d'une trousse immunodot. Cette partie se compose d'un distributeur contenant 24 pastilles d'antigènes sécables. Dans le cas présent, les pastilles permettent la détection des auto-anticorps IgG dirigés contre l'antigène M2 native (nPDC) dans le sérum humain.

Plus d'information sur la gamme BlueDiver Combi est disponible par l'intermédiaire de votre distributeur ou sur notre site www.d-tek.be (MSDS).

2 PRINCIPE DU TEST

Un test complet BlueDiver Combi se compose d'une ou plusieurs pastilles d'antigènes (montée(s) sur un porte-bandelettes) et d'une cartouche contenant les réactifs. Les porte-bandelettes et les cartouches de réactifs doivent être commandés séparément des pastilles d'antigènes.

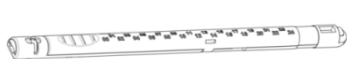
Les pastilles d'antigènes se vendent dans des distributeurs de 24 unités sécables. L'utilisateur choisit lui-même les antigènes à tester et les assemble sur un porte-bandelettes (on utilise un porte-bandelettes par patient et on peut fixer 6 pastilles au plus par porte-bandelettes. ATTENTION : toujours commencer à charger le porte-bandelettes par le BAS !!). Chaque porte-bandelettes est utilisé en combinaison avec une cartouche contenant les réactifs nécessaires au test (diluent pour échantillon, tampon de lavage, conjugué et substrat). Le test se fait sur le BlueDiver Instrument (BDI).



Le test est basé sur une méthode immuno-enzymatique. Durant l'automatisation du test, le *BlueDiver Instrument* incube les bandelettes successivement dans les puits des cartouches contenant les réactifs prêts à l'emploi. En résumé : les bandelettes sont d'abord incubées avec le sérum dilué du patient. Les anticorps, s'ils sont présents dans l'échantillon, se lient à l'antigène/aux antigènes spécifique(s) sur la membrane. La fraction non liée est éliminée par lavage dans l'étape suivante. Ensuite les bandelettes sont incubées avec les immunoglobulines anti-IgG humaines conjuguées à de la phosphatase alcaline. Le conjugué se lie aux complexes antigènes-anticorps à la surface de la membrane. Après une étape de lavage permettant d'éliminer l'excès de conjugué, les bandelettes sont incubées dans une solution de chromogène/substrat ; celle-ci 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

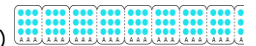
Distributeur (1 unité)



contenant ∇_{24} x



(pastilles d'antigènes sécables)



4 MATERIEL OBLIGATOIRE/ NECESSAIRE (MAIS NON FOURNI)

Cartouches contenant les réactifs, porte-bandelettes (vides), BDI (version minimum du logiciel : Version 85), logiciel Dr DOT (version minimum : Version 3.7), micropipettes, gants, guide mécanique pour l'insertion des pastilles sur le porte-bandelettes (en option).

5 CONSERVATION

Le distributeur doit être conservé à une température de +2°C à +8°C pendant toute sa période de validité (voir date d'expiration sur l'étiquette). Ne pas congeler.

Après première utilisation d'un distributeur, celui-ci doit être conservé à +2°C à +8°C et à l'abri de la lumière, de préférence dans son étui en aluminium et dans la boîte originale fournie.

Lorsqu'ils sont conservés correctement, tous les composants d'une trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée

6 PRECAUTIONS (voir également le mode d'emploi du BDI)

Les réactifs (pastilles) contenus dans le distributeur sont destinés au diagnostic in vitro et à une utilisation professionnelle. La trousse ne peut être utilisée que par des techniciens formés.

Les distributeurs contiennent des composants potentiellement dangereux, donc tout contact avec la peau, les yeux ou les muqueuses doit être évité. Les échantillons des patients doivent être manipulés comme s'ils étaient capables de transmettre des maladies infectieuses.

Déchets : les échantillons des patients, les bandelettes et les cartouches incubées doivent être manipulés comme des déchets infectieux ; les autres réactifs ne nécessitent pas une collecte séparée à moins que les règlements officiels le spécifient autrement.

D-tek s.a. et ses distributeurs autorisés ne peuvent être tenus responsables en cas de dommages directs ou indirects suite à un changement ou une modification de la procédure décrite. Dans tous les cas, les BPL doivent s'appliquer à l'utilisation de cette trousse avec toutes les règles générales ou individuelles en vigueur.

7 PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS, MANIPULATION ET CONSERVATION

Les échantillons peuvent être constitués de sérum ou de plasma. Le test doit être utilisé de préférence sur des échantillons récemment prélevés. Les séra 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 quelques jours ou congelés à -20°C pour de plus longues périodes. Eviter les cycles répétés de congélation/décongélation des échantillons.

8 PROCEDURE DE TEST

INDICATIONS PRELIMINAIRES, MANIPULATION ET CONSEILS:

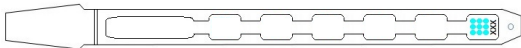
Principe de la procédure de test:

Après l'insertion manuelle des porte-bandelettes et des cartouches de réactifs, le *BlueDiver Instrument* réalise automatiquement les incubations et les étapes de lavage. Par son mouvement continu, l'automate *BlueDiver Instrument* assure une circulation efficace des réactifs prêts à l'emploi sur la bandelette. Toute la procédure de test doit être effectuée à température ambiante.

Description du porte-bandelettes:

La face réactive (avant) du porte-bandelettes montre le côté sur lequel les antigènes ont été fixés (les antigènes apparaissent sous forme de trois rangs de dots légèrement colorés en bleu). Cette coloration garantit que tous les antigènes ont été correctement adsorbés sur la membrane. Elle disparaît pendant la première étape de la procédure. La face avant affiche également, en dessous des trois rangées de dots, la référence BlueDiver Combi de la pastille (cfr page 1, référence en dessous du nom et de la référence du produit).

ATTENTION : toujours commencer à charger le porte-bandelettes par le BAS !!



La face non-réactive (arrière) des porte-bandelettes contient un code à barres 2D pour chaque pastille. Ce code permet l'identification de la pastille une fois le porte-bandelettes enlevé du peigne (à la fin du test).



Les porte-bandelettes doivent être insérés manuellement dans le peigne prévu à cet effet avant de démarrer le test automatisé (cf. Préparation du test, pt 8.1.4). Durant cette opération, veiller à ne pas toucher directement avec les doigts les membranes de nitrocellulose. Veiller à porter des gants de laboratoire et à manipuler les bandelettes par leurs supports en plastique (porte-bandelettes).

Description des cartouches de réactifs:

Les cartouches de réactifs sont composées de 7 puits différents remplis de réactifs prêts à l'emploi. Les cartouches sont scellées (et les réactifs hermétiquement séparés). Elles doivent être descellées avant de démarrer le test. Une fois ouverte, veiller à manipuler les cartouches avec précaution de manière à éviter la perte de réactifs ou une contamination entre les puits.

La face arrière des cartouches est étiquetée au moyen d'un code alphanumérique et d'un code à barres qui permet l'identification par le *BlueDiver Instrument* du type de cartouche ainsi que du numéro de lot de celle-ci.

Les cartouches doivent être chargées manuellement dans le porte-cartouches prévu à cet effet avant de démarrer le test automatisé (cf. pt 8.1.10). La face avant présente à sa base une forme triangulaire, la face arrière à sa base et au sommet une forme carrée. Ces formes sont utilisées pour sécuriser l'insertion des cartouches et comme détrompeur pour leur orientation dans le porte-cartouches

8.1 Préparation du test

- Amener tous les réactifs à température ambiante (+18°C à +25°C) avant utilisation.
- Une liste de travail (soit éditée par le logiciel Dr DOT, soit une liste externe) pourrait faciliter le chargement correct des pastilles d'antigènes, bandelettes, cartouches et échantillons de patients.
- Vérifier que le porte-cartouches est bien fixé dans son emplacement dans le *BlueDiver Instrument*.
- Vérifier que le *BlueDiver Instrument* est branché.
- Vérifier que tous les tests portent le même numéro de protocole.

La liste des étapes ci-dessous résume le chargement et la préparation du *BlueDiver Instrument*, des porte-bandelettes, des cartouches et des échantillons de patient avant le début du test. Consulter le Manuel Utilisateur du *BlueDiver Instrument* pour des informations plus détaillées en cas de problème.

1. Allumer le *BlueDiver Instrument* et attendre quelques secondes jusqu'à ce que la date et l'heure s'affichent sur l'écran tactile.
2. Confirmer la date et l'heure en appuyant sur ✓ à l'écran tactile (en cas de première utilisation ou lors d'un reset, consulter le Manuel Utilisateur du *BlueDiver Instrument*) → "Initialiser?" est affiché à l'écran.
3. Confirmer l'initialisation en appuyant sur ✓ → le bras horizontal de l'automate se place automatiquement en position centrale → "Charger bandelettes (24)" est affiché.
4. (Veiller à ne pas confirmer le nombre de bandelettes directement). Enlever le peigne de son emplacement sur le bras horizontal en le soulevant doucement. Insérer les bandelettes à tester : tenir le peigne face numérotée vers le haut (position ouverte) et insérer les bandelettes, également face numérotée (réactive) vers le haut, en introduisant la partie supérieure des porte-bandelettes (langue) dans l'espace prévu à cet effet du peigne. Vérifier la bonne insertion en appliquant une légère pression sur le porte-bandelettes.

Notes:

- Charger toujours de la position 1 du peigne (côté gauche) et ne pas laisser d'espaces vides entre les bandelettes.
 - Lorsque toutes les bandelettes sont chargées, vérifier visuellement l'alignement vertical, horizontal et latéral des bandelettes. Tout mauvais alignement doit être corrigé en sortant les bandelettes du peigne et en les insérant à nouveau.
 - Des résidus plastiques peuvent se former lors de la séparation des bandelettes et provoquer des décalages sur le peigne ; pour éviter des problèmes lors de la réalisation des tests sur le BDI ou lors de la lecture avec le logiciel Dr DOT, ceux-ci doivent être éliminés avec une simple paire de ciseaux.
5. Replacer le peigne dans son emplacement sur le bras vertical du *BlueDiver Instrument* en poussant légèrement vers le bas.
 6. Sélectionner le nombre de bandelettes chargées sur le peigne en utilisant les flèches haut et bas sur l'écran tactile.
 7. Confirmer le nombre de bandelettes chargées en appuyant sur ✓ → le bras horizontal se déplace alors automatiquement vers l'arrière de la machine et se positionne au-dessus des trous de référence du porte-cartouches → "Vérifier alignement" est affiché à l'écran.
 8. Utiliser la fonction "Pas à Pas" pour vérifier l'alignement correct des bandelettes: maintenir une légère pression sur la flèche (bas) jusqu'à ce que les porte-bandelettes entrent dans les trous de référence. Si l'alignement est correct, les bandelettes ne touchent pas le bord des trous de référence.
Note: en cas de mauvais alignement (contact des bandelettes avec le porte-cartouches), consulter le Manuel Utilisateur du *BlueDiver Instrument*.
 9. Confirmer le bon alignement des bandelettes en appuyant sur ✓ → le *BlueDiver Instrument* descend les bandelettes complètement dans les trous de référence et commence la lecture des codes à barres des bandelettes → une fois la lecture des codes à barres terminée, l'écran affiche "Insérer les cartouches".
Note: si un ou plusieurs codes à barres des bandelettes n'est pas lu (LED clignotantes aux positions non-lues), consulter le Manuel Utilisateur du *BlueDiver Instrument*.
 10. Ouvrir les cartouches de réactifs et les insérer, sous leur bandelette respective, dans l'encoche prévue à cet effet du porte-cartouches.
 11. Confirmer l'insertion des cartouches en appuyant sur ✓ → le *BlueDiver Instrument* procède à la lecture des codes à barres des cartouches et vérifie la bonne association avec les bandelettes → une fois la lecture des codes à barres terminée, le nombre de bandelettes (associations bandelettes/cartouches validées) est affiché.
Note: dans le cas où un ou plusieurs codes à barres de cartouche sont illisibles, ou dans le cas d'une mauvaise association bandelette/cartouche (LED clignotantes aux positions correspondantes), consulter le Manuel Utilisateur du *BlueDiver Instrument*.
 12. Confirmer le nombre de bandelettes en appuyant sur ✓ → le numéro de protocole identifié sur les codes à barres est affiché à l'écran (**ID protocole : xx.**).

13. Confirmer le numéro de protocole en appuyant sur → "**Fermer le capot svp**" est affiché à l'écran.
14. Fermer le capot du *BlueDiver Instrument* et confirmer la fermeture en appuyant sur → le *BlueDiver Instrument* réalise un premier lavage (prétraitement) en incubant les bandelettes dans le 2^{ème} puits des cartouches (Etape de lavage: 1 minute) → A la fin de cette étape, l'écran affiche "**Ouvrir le capot svp**".
15. Ouvrir le capot du *BlueDiver Instrument* et confirmer l'ouverture en appuyant sur → le bras horizontal se déplace alors automatiquement vers l'avant de la machine et présente les bandelettes à l'utilisateur → l'écran affiche "**Sécher les bandelettes**".
16. Sécher les bandelettes en appuyant doucement le papier absorbant à la base des porte-bandelettes, au niveau de la petite cavité servant à charger l'échantillon.
17. Confirmer le séchage des bandelettes en appuyant sur → l'écran affiche "**Pipeter les échantillons**".
18. Pipeter les échantillons en insérant 10 µl de sérum/plasma de patient dans la petite cavité à la base des porte-bandelettes.
Note: Alternativement, les 10µl de sérum peuvent être déposés directement dans le diluent (1^{er} puits de la cartouche). Cette intervention peut être réalisée à n'importe quel moment après l'ouverture de la cartouche (voir point 8.1.10).
19. Confirmer l'ajout des échantillons en appuyant sur → "**Fermer le capot svp**" est affiché à l'écran.
20. Fermer le capot du *BlueDiver Instrument* et confirmer la fermeture en appuyant sur → le *BlueDiver Instrument* démarre automatiquement le test en suivant les étapes décrites ci-dessous:

8.2 Réalisation du test (Protocole 02)

Étape	Description	Temps
01.	Les bandelettes sont incubées dans le 1 ^{er} puits de la cartouche (<i>Diluent pour échantillon</i>). Une fois en contact avec le diluent, l'échantillon préalablement pipeté (cf. 8.1.18) est libéré de la petite cavité et dilué grâce à l'agitation.	30 min
02.	Le peigne se déplace vers l'avant et les bandelettes sont incubées dans le 2 ^{ème} puits (<i>Tampon de lavage</i>).	2 min
03.	Le peigne se déplace vers l'avant et les bandelettes sont incubées dans le 3 ^{ème} puits (<i>Tampon de lavage</i>).	2 min
04.	Le peigne se déplace vers l'avant et les bandelettes sont incubées dans le 6 ^{ème} puits (<i>Tampon de lavage</i>).	2 min
05.	Le peigne se déplace vers l'arrière et les bandelettes sont incubées dans le 5 ^{ème} puits (<i>Conjugué</i>).	10 min
06.	Le peigne se déplace vers l'arrière et les bandelettes sont incubées dans le 4 ^{ème} puits (<i>Tampon de lavage</i>).	2 min
07.	Le peigne se déplace vers l'arrière et les bandelettes sont incubées dans le 3 ^{ème} puits (<i>Tampon de lavage</i>).	2 min
08.	Le peigne se déplace vers l'arrière et les bandelettes sont incubées dans le 2 ^{ème} puits (<i>Tampon de lavage</i>).	2 min
09.	Le peigne se déplace vers l'avant et les bandelettes sont incubées dans le 7 ^{ème} puits (<i>Substrat</i>).	10 min
10.	Le peigne se déplace vers l'arrière et les bandelettes sont incubées dans le 6 ^{ème} puits (<i>Tampon de lavage</i>).	2 min

Une fois le test terminé, le peigne se déplace en position centrale pour faciliter la manipulation du peigne. L'automate émet un beep et l'écran affiche "**Test fini**".

Sécher les bandelettes en appuyant doucement le papier absorbant à la base des porte-bandelettes, au niveau de la petite cavité servant à charger l'échantillon et laisser les bandelettes sécher pendant 30 minutes avant d'interpréter les résultats. L'interprétation doit être faite dans les 24 heures qui suivent la réalisation du test.

ENREGISTREMENT DES DONNEES DU TEST

Le protocole du test peut être téléchargé en appuyant sur le symbole de la clé USB et en suivant les indications à l'écran (Insérer clé USB → Ecriture clé USB → Enlever clé USB). Cette étape n'est pas obligatoire, mais fortement recommandée pour établir la traçabilité et répondre à certaines exigences réglementaires

9 INTERPRETATION DES RESULTATS

L'évaluation des résultats est réalisée via le logiciel Dr DOT et le scanner BlueScan.

Pour plus d'information sur le logiciel Dr DOT, prendre contact avec le distributeur ou via le site internet www.d-tek.be.

NB: Le logiciel Dr DOT est seulement un logiciel d'aide à l'interprétation. L'interprétation clinique finale doit toujours être réalisée par un clinicien ou un médecin expérimenté.

1. Enlever le peigne du *BlueDiver Instrument* et laisser les porte-bandelettes contenant les bandelettes attachés au peigne.
2. Insérer le peigne dans l'emplacement prévu à cet effet dans le capot du scanner BlueScan. Veiller à introduire le peigne de telle manière que la face réactive des bandelettes soit sur la vitre du scanner.
3. Démarrer la numérisation des bandelettes au moyen du logiciel Dr DOT.

Pour plus d'information concernant le logiciel Dr DOT et le BlueScan, se référer au Manuel Utilisateur du logiciel Dr DOT.

9.1 Résultats

Chaque pastille d'antigène contient des **contrôles positifs et négatifs (Cut-Off)** incorporés (déposés en triplet; le logiciel Dr DOT mesure l'intensité du triplet d'antigène et la compare à l'intensité du Cut-Off.

<p>RESULTAT POSITIF: Un échantillon est considéré comme positif pour un anticorps spécifique si la valeur de l'intensité de coloration du triplet d'antigène est supérieure à la valeur CO (également sous forme de triplet sur la pastille). Dans la feuille principale des résultats, le logiciel Dr DOT met en évidence l'antigène pour lequel le résultat est positif et indique la valeur numérique calculée entre parenthèses</p>	<p>----> RC – Contrôle Positif ----> Antigène ----> CO – Contrôle Négatif</p>
<p>RESULTAT NEGATIF: Un échantillon est considéré comme négatif pour un anticorps spécifique si la valeur de l'intensité de coloration du triplet d'antigène est égale ou inférieure à la valeur CO (également sous forme de triplet sur la pastille).</p>	<p>----> RC – Contrôle Positif ----> Antigène ----> CO – Contrôle Négatif</p>

Unités arbitraires Dr DOT (UA)	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 répétitions statistiquement représentatives dans un même essai ou lors de différents essais pour calculer respectivement la variation intra- et inter-assay. Dans tous les cas, l'intensité des dots était dans un intervalle spécifique et l'écart-type était inférieur à 10 %. *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.

		M2/nPDC	
		+	-
+	vrai positif	48	faux positif 5
	faux négatif	3	vrai négatif 83
Sensibilité		94%	
Spécificité		94%	

11. LIMITES DU TEST

1. Le diagnostic ne doit pas être établi uniquement sur base d'une seule méthode de test.
2. 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 BlueDiver Dot. L'immunofluorescence étant reconnue comme méthode de référence en auto-immunité.
3. D-tek s.a. 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. L'utilisation de cette trousse est réservée uniquement à un personnel technique qualifié.
4. 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.
5. La responsabilité de D-tek s.a. se limite dans tous les cas au remplacement de la trousse.