

TEST DE DÉPISTAGE ENA À PUIITS UNIQUE RELISA® DES ANTICORPS ANTI-ANTIGÈNES NUCLÉAIRES SOLUBLES

Pour utilisation diagnostique in vitro

Pour l'Usage Professionnel

Référence catalogue: 7096-10 (96 puits) et 7696-10 (576 puits)

UTILISATION PRÉVUE: Il s'agit d'un système de test par immunodosage enzymatique (EIA) pour la détection des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires solubles Sm (Smith), RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 et Jo-1 dans le sérum humain. Les résultats de ce dosage peuvent être utilisés comme aide au diagnostic des maladies auto-immunes.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Les anticorps anti-antigènes nucléaires solubles (ENA) ont été associés à plusieurs syndromes auto-immuns et semblent avoir une valeur diagnostique et/ou pronostique dans la sclérodémie (1, 2), la connectivité mixte (3-5), le syndrome de Sjögren (6, 7), la polymyosite (8), la dermatomyosite (9), le lupus érythémateux disséminé (5) et la polyarthrite rhumatoïde (10). Le test ANA (anticorps anti-nucléaires) a été utilisé pour dépister ces anticorps mais il n'indique pas la spécificité de l'anticorps, et les anticorps dirigés contre certains antigènes nucléaires solubles ne sont pas positifs au test ANA (11, 12). Par conséquent, un second test de confirmation de la présence d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles est fortement recommandé (13).

L'antigène Sm (Smith) a été identifié en 1966 par Tan et Kunkel. Il s'agit d'une glycoprotéine non histone soluble saline, non dépendante de l'ADN ou de l'ARN quant à son antigénicité (14). Les anticorps anti-Sm sont considérés comme un marqueur très spécifique en raison de leur degré élevé de spécificité au lupus érythémateux disséminé (LED). Ils sont présents chez plus de 30% des patients atteints d'un LED et ont été associés à la néphropathie évolutive et à la cérébrite (15-17).

L'anticorps Sm est souvent associé à l'anticorps U1-RNP dans les sérums de patients atteints d'un LED (18, 19). À l'inverse de l'anticorps Sm, l'anticorps RNP n'est pas considéré comme un marqueur sérologique spécifique car on observe sa présence chez les patients atteints de diverses maladies rhumatismales, notamment d'un LED, du syndrome de Sjögren et de polyarthrite rhumatoïde. Un taux élevé d'anticorps anti-RNP est toutefois souvent associé à un syndrome de chevauchement appelé connectivité mixte (MCTD). Les patients atteints d'une MCTD présentent la plupart du temps une association de signes cliniques observés dans le LED, la sclérodémie et la polymyosite. Ces patients réagissent souvent bien à un traitement corticostéroïde et présentent une incidence de néphropathie plus faible que les patients atteints de LED (20, 21).

Les SSA et SSB ont initialement été décrits comme des antigènes nucléaires protéine-ARN chez les patients atteints du syndrome de Sjögren (6, 7). Les Ro et La ont été décrits comme des antigènes cytoplasmiques protéine-ARN chez les patients atteints de LED (22, 23). Il est maintenant largement reconnu que, d'une part, le SSA et le Ro et, d'autre part, le SSB et le La sont analogues et que ces antigènes se trouvent à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Les anticorps anti-SSA/Ro seuls ou anti- SSA/Ro et SSB/La sont observés chez 62% des patients souffrant de lupus cutané subaigu (24) et chez 85% des patients atteints du syndrome de Sjögren qui développent une vascularite (25). Les anticorps anti-SSA/Ro seuls apparaissent chez les patients ayant un déficit homozygote de la fraction C2 (26), chez les patients souffrant de cirrhose biliaire primitive qui développent le syndrome de Sjögren (27) et chez deux tiers des patients atteints de «SLE négatif aux ANA» (28). L'antigène SSA/Ro est un complexe de petites particules ribonucléoprotéiques (protéines associées : Ro60, Ro52).

La protéine la plus importante est le polypeptide de 60 kD appelé SSA/Ro60. Ce complexe est parfois appelé SS-A/Ro Hy-RNA, incluant également la protéine SS-B/La. Ro60 est fortement associé au complexe "SSA/Ro hY-RNA", Ro52 est faiblement associé à ce complexe.

L'antigène Scl-70 a été identifié comme une enzyme cellulaire, l'ADN topoisomérase de type I (30). Les anticorps anti-Scl-70 ont été observés chez 56% de patients souffrant de sclérodémie généralisée, particulièrement le sous-groupe de patients atteints de sclérodémie diffuse (31). Ces auto-anticorps sont considérés comme un marqueur de la sclérodémie car ils ne sont pas observés dans d'autres collagénoses.

Les anticorps anti-Jo-1, qui est l'enzyme cellulaire histidyl-ARNt-synthétase, sont observés chez 25 à 30% des patients atteints de polymyosite ou de dermatomyosite et non dans les autres myopathies (11, 32). Il a également été démontré que les anticorps anti-Jo-1 sont fortement corrélés à la pneumopathie interstitielle associée à la myosite (32).

PRINCIPE DU TEST

Ce test est un immunodosage enzymatique indirect qualitatif. Un mélange d'antigènes nucléaires solubles purifiés par affinité stabilisés a été déposé à la surface des micropuits pour servir de substrat antigénique dans ce système. Les dilutions des échantillons de patient sont placées dans les micropuits et mises à incuber, ce qui permet aux anticorps spécifiques de l'échantillon de réagir par rapport à l'antigène pendant la phase solide. Après le lavage visant à éliminer les anticorps non liés et les autres protéines sériques, les puits sont mis à incuber avec des anticorps anti-humains de chèvre marqués par de la peroxydase de raifort. La préparation d'anticorps conjugué à de la peroxydase de raifort incluse dans le système est spécifique aux chaînes lourdes et légères de l'IgG humaine.

Après incubation avec le conjugué de peroxydase de raifort, on observe la formation d'un complexe tripartite stable si les résultats sont positifs. Ce complexe se compose d'un anticorps anti-humain conjugué à de la peroxydase de raifort lié à un anticorps anti-ENA humain, lui-même lié à l'antigène stabilisé sur la surface en plastique.

Après un deuxième lavage, ce complexe est détecté par ajout d'une solution de tétraméthylbenzidine (TMB) et de H₂O₂ servant de substrat chromogène. Le degré de développement de la couleur dans chaque puits est proportionnel à la concentration en anticorps anti-ENA dans chaque échantillon de sérum. Chaque micropuits est lu à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.

COMPOSITION DES SYSTÈMES - MATÉRIELS FOURNIS

Conservation: Tous les composants doivent être conservés au réfrigérateur entre 2 et 10°C. Ne pas congeler.

Stabilité: Tous les composants sont stables pendant 12 mois à partir de la date de fabrication. Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.

RÉACTIFS

Barrettes de micropuits recouvertes d'antigènes nucléaires solubles [PLATE]: Référence catalogue 7008-10. Une microplaque contenant 12 barrettes de 8 puits recouvertes d'un mélange de sept antigènes nucléaires solubles purifiés par affinité et stabilisés (Sm, RNP, SSA/Ro60, Ro52, SSB/La, Scl-70 et Jo-1). Le code couleur de ces barrettes est marron. Si le test requiert moins de huit puits, ils peuvent être séparés par simple rupture. Conserver les barrettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet absorbeur d'humidité, fermer hermétiquement, puis réfrigérer pendant 45 jours maximum.

Diluant pour échantillon [SOLN|DIL]: Référence catalogue 7100 (100 ml). Diluant tamponné propriétaire, utilisé pour diluer les échantillons de patient.

Réactif immuno-enzymatique - Spécifique aux chaînes lourdes et légères d'IgG humaine [CONJ|HRP]: Référence catalogue 7009-10 (14 ml). Anti-IgG humaine (chaînes lourdes et légères) couplée à de la peroxydase de raifort (HRP). Le réactif est prêt à l'emploi.

Solution de substrat [SOLN|SUB]   : Référence catalogue 7035 (14 ml). Solution de substrat enzymatique spécifique à la HRP, contenant de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) stabilisés. Le réactif est prêt à l'emploi. **DANGER:** Inflammable. Ce réactif contient moins de 25% de méthanol et d'acétone. Conserver hors de portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

Réactif d'arrêt SOLN|STOP   : Référence catalogue 7033 (14 ml). Réactif d'arrêt propriétaire pour les systèmes de test EIA d'Immuno Concepts. Le réactif est prêt à l'emploi. **DANGER:** Corrosif. Ce réactif contient de l'acide chlorhydrique et sulfurique (moins de 3 % chacun par volume) et doit être manipulé avec précaution. Conserver hors de portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Ne jamais ajouter d'eau à ce réactif.

Sérum étalon ENA CAL: Référence catalogue 7026-10 (2 ml). Sérum humain qui contient des anticorps dirigés contre un ou plusieurs des antigènes nucléaires solubles Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 et/ou Jo-1. La valeur de dosage pour ce sérum est indiquée sur l'étiquette du flacon. Ce sérum est prédilué et prêt à l'emploi.

Contrôle positif ENA CONTROL|+: Référence catalogue 7021-10 (2 ml). Sérum de contrôle positif humain qui contient des anticorps dirigés contre un ou plusieurs des antigènes nucléaires solubles Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 et/ou Jo-1. Ce sérum est prédilué et prêt à l'emploi.

Contrôle négatif ENA CONTROL|-: Référence catalogue 7031 (2 ml). Sérum de contrôle négatif humain qui ne contient pas d'anticorps anti-antigènes Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 ou Jo-1. Ce sérum est prédilué et prêt à l'emploi.

Contrôle positif non dilué ENA optionnel OPT+: Référence catalogue 7022-10 (0,25 ml). Sérum de contrôle positif humain qui contient des anticorps dirigés contre un ou plusieurs des antigènes nucléaires solubles Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 et/ou Jo-1. Traiter ce contrôle positif comme un sérum non dilué.

COMPOSANTS NON RÉACTIFS

Support pour bandelettes de micropuits

Solution tampon de lavage:

Tampon PBS PWDR|PBS: Référence catalogue 1011. Solution saline tamponnée au phosphate en poudre (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Chaque sachet contient une quantité suffisante de poudre tampon pour préparer un litre de tampon. Chaque système complet contient deux sachets de poudre tampon pour chaque plateau de 96 micropuits.

Concentré tampon de lavage SOLN|WASH: Référence catalogue 1031 (10 ml). Solution Tween 20 à 5% à utiliser dans le tampon de lavage. Chaque système complet contient deux flacons de concentré tampon pour chaque plateau de 96 micropuits.

Préparation: Dissoudre un sachet de poudre tampon dans un litre d'eau désionisée ou distillée. Ajouter tout le contenu d'une bouteille de concentré tampon de lavage au PBS dissous. Bien mélanger et conserver au entre 2 et 25°C pendant 4 semaines maximum ou jusqu'à ce que des signes de contamination ou de modifications visibles apparaissent. La solution tampon de lavage doit être à température ambiante (18-25°C) avant utilisation.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE REQUIS - MAIS NON FOURNI

Pipeteurs volumétriques de précision permettant de prélever 25 à 1 000 µl
Pissette en plastique pour distribuer la solution tampon de lavage dans les micropuits ou système de lavage des micropuits automatisé ou semi-automatisé
Récipient d'un litre pour la solution tampon de lavage PBS
Eau désionisée ou distillée
Spectrophotomètre lecteur de microplaques capable de lire la densité optique à 450 nm
Tubes à essai pour préparer les dilutions de sérum
Papier absorbant ou serviettes en papier
Pipeteur multicanaux capable de remplir 8 puits à la fois
Gants jetables
Chronomètre de laboratoire

PRÉCAUTIONS

1. Tous les matériels d'origine humaine utilisés dans la composition de ce produit ont été testés et se sont révélés négatifs (non-réactivité répétée) vis-à-vis des anticorps des virus de l'immunodéficience humaine 1 et 2 (vih 1 et 2), de l'anticorps du virus de l'hépatite C (hcv) et de l'antigène de surface de l'hépatite B (hbsag), selon les méthodes approuvées par la fda. Néanmoins, aucune méthode de test ne peut assurer totalement l'absence de vih-1, vih-2, hcv, hbv ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, tous les matériels du kit doivent être manipulés de la même manière que des matériels considérés comme potentiellement infectieux.
2. Tous les sérums de contrôle, sérums étalons et échantillons de patient doivent être manipulés conformément aux recommandations du niveau de biosécurité 2, comme pour tout échantillon de sérum ou de sang humain potentiellement infectieux, telles qu'indiquées dans le manuel du Centers for Disease Control/National Institutes of Health: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. L'azide de sodium (0,09%) est utilisé comme conservateur dans les sérums de contrôle et étalons. Il est possible que l'azide de sodium réagisse au contact des canalisations en plomb ou en cuivre et forme des azides métalliques extrêmement explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer abondamment les canalisations avec de l'eau afin d'éviter toute accumulation de résidus. L'azide de sodium est un poison et peut être toxique en cas d'ingestion.
4. La dilution des composants ou l'utilisation de composants autres que ceux fournis dans ce système peut produire des résultats incohérents.
5. Ne pas procéder à une inactivation à la chaleur des échantillons de sérum utilisés pour le test de dépistage ENA RELISA[®], car cela peut entraîner des valeurs élevées.
6. Ce kit est destiné à une utilisation diagnostique *in vitro*.
7. Ne pas pipeter avec la bouche et éviter tout contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs et les échantillons. En cas de contact, laver abondamment avec un savon germicide et de l'eau.
8. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones où les échantillons ou les réactifs du kit sont manipulés.
9. Éviter toute éclaboussure ou pulvérisation d'aérosols à tout moment.
10. Les durées et températures d'incubation autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés.
11. La contamination croisée des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats. Pendant le test, les échantillons doivent rester confinés dans les micropuits.
12. Avant utilisation, la verrerie réutilisable doit être lavée et rincée soigneusement afin d'éliminer tout détergent. Toute la verrerie doit être propre et sèche avant utilisation.
13. Avant utilisation, porter les réactifs, micropuits et échantillons à température ambiante (18-25°C).
14. Mettre des gants jetables pour manipuler les échantillons et les réactifs puis se laver soigneusement les mains en fin de procédure technique.
15. La contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
16. Le réactif d'arrêt est corrosif et peut provoquer des brûlures. Ce réactif contient de l'acide chlorhydrique et sulfurique (moins de 3 % chacun par volume) et doit être manipulé avec précaution. Conserver hors de portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Ne jamais ajouter d'eau à ce réactif.

PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

Prélèvement: Le sérum est l'échantillon préférentiel. Environ 5 ml de sang entier doivent être prélevés de manière aseptique par ponction veineuse à l'aide d'un tube à prélèvement sous vide stérile ou tout autre système de prélèvement adapté. Laisser le sang coaguler à température ambiante (18-25°C). Le sérum doit être séparé du caillot par centrifugation aussi rapidement que possible, de façon à limiter l'hémolyse.

ATTENTION: *Ne pas procéder à une inactivation à la chaleur des échantillons de sérum utilisés pour le test de dépistage ENA RELISA[®], car cela peut entraîner des valeurs élevées.*

Substances interférentes: Les sérums présentant un degré élevé d'hémolyse, d'ictère, de lipémie ou de prolifération microbienne doivent être écartés car ces anomalies peuvent engendrer des résultats aberrants. Les échantillons contenant des particules visibles doivent être clarifiés par centrifugation avant de procéder au test.

Conservation: Les sérums peuvent être conservés entre 2 et 10°C pendant une semaine maximum. Si le test est reporté, ils doivent être congelés à -20°C minimum. Le sérum ne doit pas être conservé dans un réfrigérateur ou un congélateur à dégivrage automatique.

ATTENTION: Les congélations et décongélations successives des échantillons de patient peuvent induire des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

REMARQUES GENERALES RELATIVES A LA PROCEDURE

1. Il est extrêmement important que tous les composants du kit et les échantillons de sérum soient à température ambiante (18-25°C) avant utilisation. Il faut à un litre entier de tampon de lavage plusieurs heures pour atteindre 20°C à sa sortie du réfrigérateur. Les températures d'incubation au-dessus ou en dessous de la plage indiquée peuvent donner des résultats inexacts. Remettre les échantillons et les réactifs non utilisés au réfrigérateur après utilisation.
2. Avant utilisation, bien mélanger les réactifs en les retournant doucement de haut en bas. Ne pas créer de tourbillon dans les réactifs ou les secouer. Éviter la formation de mousse.
3. Lors de la préparation des dilutions d'échantillon, essuyer les embouts des pipettes avant de distribuer le sérum dans le diluant pour échantillon. Si un excès d'échantillon adhère à l'embout de la pipette, les résultats s'en trouveront affectés.
4. L'utilisation d'un pipeteur multicanaux est recommandée car il permet d'uniformiser la distribution du réactif ainsi que les durées d'incubation et de réaction.
5. **Un lavage adéquat des puits est extrêmement important.** Des puits mal lavés afficheront des valeurs de bruit de fond élevées ainsi que des valeurs faussement positives. Pour le lavage manuel, aspirer le contenu des puits puis remplir ceux-ci de solution tampon de lavage. Éviter la contamination croisée des puits, en particulier lors du premier lavage suivant l'aspiration. Vider toute la solution tampon de lavage des puits en les renversant puis en les secouant d'un geste sec du poignet afin d'éliminer tout résidu. Répéter ces étapes (remplissage/élimination) jusqu'à effectuer 3 à 5 lavages au total. Frapper ensuite vigoureusement les puits sur une serviette en papier ou une autre matière absorbante pour éliminer toute trace résiduelle de tampon de lavage. Pour un lavage homogène des puits, il est recommandé d'utiliser un système automatisé.
REMARQUE : En raison des divers types de techniques de lavage et de systèmes automatisés, le nombre de lavages peut être adapté pour obtenir des résultats optimaux. Chaque laboratoire doit déterminer le nombre de lavages le plus efficace pour son système de lavage.
6. Une élimination inadaptée des résidus de tampon de lavage peut conduire à un développement inadapté de la couleur. Sécher les bandelettes de micropuits sur du papier ou des serviettes absorbants afin d'éliminer au maximum les résidus de tampon de lavage.
7. Le respect du minutage de toutes les étapes est essentiel. Tous les échantillons de sérum doivent être dilués avant le début de la procédure et déposés dans les micropuits aussi rapidement que possible (moins de cinq minutes). La taille des lots doit être définie de manière à ce que la manipulation des échantillons puisse être accomplie sans précipitation dans ce laps de temps. Il est recommandé d'utiliser un pipeteur multicanaux qui facilite la manipulation des échantillons et des réactifs.
8. À l'exception de la dernière incubation (solution de substrat), chaque période d'incubation commence dès la fin de la distribution de l'échantillon ou du réactif. L'incubation de la solution de substrat doit durer exactement 30 minutes pour chaque puits. Tous les échantillons et réactifs doivent être déposés dans le même ordre et à un rythme constant.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

CALCULS

1. Soustraire la valeur de densité optique du blanc de réactif des valeurs de densité optique obtenues dans les puits d'échantillonnage, de contrôle et d'échantillon du patient. Calculer les valeurs de densité optique moyennes pour les doubles de puits.
2. Diviser la concentration en anticorps spécifique du sérum étalon (indiquée sur l'étiquette) par la valeur de densité optique moyenne des puits d'échantillonnage pour obtenir le facteur de conversion.
3. Multiplier les valeurs de densité optique de chacun des échantillons par le facteur de conversion afin d'obtenir la concentration en anticorps spécifique en unités.
4. La forme simplifiée de ces calculs peut être exprimée comme suit:

$$\frac{Uc}{\lambda c} \times \lambda s = Us$$

Uc = Valeur étalon (unités)

λc = Densité optique de l'étalon*

λs = Densité optique de l'échantillon*

Us = Valeur unitaire pour l'échantillon

*Si les étalons et les échantillons sont analysés en double, utiliser la densité optique moyenne des doubles de puits.

CONTRÔLE QUALITÉ

1. La valeur de densité optique moyenne des puits étalons doit être d'au moins 0,400. Les valeurs de densité optique inférieures à 0,400 indiquent un développement de la couleur inadéquat et une analyse non valide. Un développement inadéquat de la couleur est généralement dû à l'utilisation de réactifs froids ou au non respect du minutage d'une ou plusieurs étapes du dosage. Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante (18-25°C) et répéter l'analyse en veillant à respecter le minutage de toutes les étapes.
2. Le puits de contrôle à blanc doit avoir une valeur de densité optique inférieure à 0,150. Les valeurs de densité optique à blanc supérieures à 0,150 indiquent un lavage inadéquat ou une contamination des réactifs.
3. Les échantillons dont les valeurs d'anticorps spécifiques sont supérieures à la limite maximale de l'étalon doivent être rendus comme positifs avec un titre « supérieur à ou égal » au titre indiqué sur l'étiquette du sérum étalon.
4. Le facteur de conversion doit être calculé pour chaque analyse. L'utilisation d'un facteur de conversion d'une analyse invalidera les résultats.
5. Chaque laboratoire doit établir et conserver ses propres valeurs de plage (normale) de référence, en fonction de la population de patients étudiée et d'autres facteurs locaux.
6. Le sérum de contrôle positif est un sérum humain qui contient des anticorps dirigés contre un ou plusieurs des antigènes nucléaires solubles Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 et/ou Jo-1. Il s'agit d'un contrôle qualitatif qui doit donner une valeur supérieure à 20 unités ENA.
7. Le sérum de contrôle négatif est un pool de sérum humain qui ne contient pas d'anticorps dirigés l'un des six auto-antigènes de ce test. Il s'agit d'un contrôle qualitatif qui doit donner des valeurs inférieures à 20 unités ENA.
8. Le sérum de contrôle positif non dilué est un sérum humain qui contient des anticorps dirigés contre un ou plusieurs des antigènes nucléaires solubles Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 et/ou Jo-1. Ce contrôle doit donner une valeur supérieure à 20 unités ENA.
9. Si une valeur de contrôle est hors de la plage, le dosage n'est pas valable et doit être recommencé.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU PATIENT

1. Il s'agit d'un dosage qualitatif. Les niveaux d'anticorps détectés n'ont pas de signification clinique connue et les valeurs unitaires obtenues lors de ce dosage sont simplement destinées à répartir les patients dans les trois grands groupes suivants. Les puits d'échantillon de patient dont les valeurs sont supérieures ou égales à 25 unités ENA sont considérés comme positifs et doivent être testés pour les spécificités individuelles en ENA. Les puits d'échantillon de patient dont les valeurs sont inférieures à 20 unités ENA sont considérés comme négatifs. Les valeurs comprises entre 20 et 25 unités sont considérées comme étant limites positives; les dosages doivent être répétés ou testés pour les spécificités individuelles en ENA. Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs de référence (limite et plage) en fonction de la population de patients testés. Les valeurs unitaires sont affectées par des facteurs liés aux patients, des considérations mécaniques (précision et exactitude du pipetage, etc.) et les conditions de dosage (ex.: température et synchronisation des étapes.)
2. Étant donné que le test de dépistage à puits unique ENA RELISA[®] contient un mélange d'antigènes, les résultats représentent une combinaison des réactions des anticorps à chacun des six antigènes. Si de faibles niveaux d'auto-anticorps multiples sont présents, le test de dépistage à puits unique ENA RELISA[®] peut présenter un résultat positif mais les spécificités individuelles peuvent être inférieures aux valeurs limites de chacun.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Les résultats doivent être notés positifs ou négatifs aux anticorps anti-antigènes nucléaires solubles. Les niveaux d'anticorps n'ont pas de signification clinique connue.

LIMITES DU TEST

1. Le diagnostic ne peut pas être réalisé sur la base des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles seuls. Le médecin doit interpréter ces résultats au regard des antécédents et des symptômes du patient, des observations physiques et d'autres procédures de diagnostic.
2. Le traitement ne doit pas débuter sur la seule base d'un test positif aux anticorps anti-antigènes nucléaires solubles. Les indications cliniques, les autres analyses de laboratoire et le diagnostic clinique du médecin doivent être pris en compte avant de commencer tout traitement.
3. Certains patients souffrant de maladies auto-immunes peuvent avoir des niveaux indétectables ou insignifiants d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles et d'autres peuvent avoir des niveaux élevés mais présenter peu ou pas de signe de maladie clinique. Le médecin doit interpréter les résultats des tests des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles au regard des antécédents et des symptômes du patient, des observations physiques et d'autres procédures de diagnostic.
4. Les niveaux d'anticorps détectés avec ce système n'indiquent pas nécessairement la gravité ou la durée de la maladie.

VALEURS ESCOMPTÉES

L'incidence des auto-anticorps dirigés contre divers antigènes nucléaires varie en fonction de la population de patients et de l'incidence des maladies rhumatismales cliniques dans cette population. L'association anticorps/maladies rhumatismales spécifiques est récapitulée dans le Tableau 1.

Tableau 1

Anticorps dirigés contre:	Associations cliniques:
Sm	Anticorps marqueur extrêmement spécifique observé chez 25 à 30% des patients atteints de LED
U1-RNP	Connectivité mixte >95%; LED 35%; fréquence plus faible en cas de lupus discoïde ou de sclérodémie généralisée
SSA/Ro	Syndrome de Sjögren 60-70%; LED 50%
SSB/La	Syndrome de Sjögren 40-50%; LED 15%
Scl-70	Anticorps marqueur extrêmement spécifique observé chez 15 à 20% des patients atteints de sclérodémie généralisée
Jo-1	Anticorps marqueur extrêmement spécifique observé chez 25 à 30% des patients atteints de polymyosite ou de dermatomyosite

PLAGE DE RÉFÉRENCE

La plage de référence a été établie en testant les sérums de 403 donneurs de sang sains, 205 femmes et 198 hommes, dont aucun n'avait d'antécédents connus de maladies rhumatismales. Sur la base de ces données, les valeurs limites normales ont été établies comme étant inférieures à 20 unités ENA. Les bonnes pratiques de laboratoire imposent que chaque laboratoire établisse ses propres plages normales en fonction de sa population de patients et d'autres facteurs locaux.

PERFORMANCES

Le test de dépistage ENA à puits unique RELISA[®] d'Immuno Concepts a été comparé au test de dépistage ENA à paramètres multiples RELISA[®] d'Immuno Concepts. La population de patients étudiée comprenait 50 patients correspondant aux critères de diagnostic de lupus érythémateux disséminé, 25 patients souffrant du syndrome de myosite auto-immune ou de chevauchement de myosite, 23 sujets chez qui une sclérodémie a été diagnostiquée, 21 patients souffrant du syndrome de Sjögren, 3 patients chez qui une arthrite rhumatoïde a été diagnostiquée, 18 patients atteints de collagénose indéterminée et 403 sujets ne présentant aucune maladie auto-immune connue. Sur la base de cette comparaison, les données dans le Tableau 2 ont été obtenues.

Test de Dépistage ENA à Puits Unique RELISA [®] d'Immuno Concepts	Positif	Limite	Négatif
Positif	126	9	5
Limite	0	2	4
Négatif	1	2	394

Les résultats limites sont considérés comme positifs. Ces données induisent les statistiques suivantes: sensibilité relative, 97,9%; spécificité relative, 97,8% et agrément total, 97,8%.

REPRODUCTIBILITÉ

Six échantillons positifs et cinq négatifs ont été traités sur trois numéros de lot différents de bandelettes d'antigènes à trois occasions différentes. En aucun cas un échantillon négatif n'a donné de résultats positifs et les échantillons positifs ont uniformément donné des résultats clairement positifs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Douvas, A.S., Achten, M., and Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *J. Biol. Chem.* 254:10514-10522, 1979.
2. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M.J., et al. Autoantibodies to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1627-1631, 1980.
3. Cohen, M.L., Dawkins, B., Dawkins, R.L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
4. Sharp, G.C., Irwin, W.S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). 52:148-159, 1972.
5. Sharp, G.C., Irwin, May, L.M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm Antigens with mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus, and Other Rheumatic Diseases. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
6. Alspaugh, M.A., and Tan, E.M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1078, 1975.
7. Alspaugh, M.A., Talal, N., and Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
8. Wolfe, J.F., Adelstein, J.F., and Sharp, G.C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
9. Nishikai, M. and Reichlin, M. Purification and Characterization of a Nuclear Non-histone Basic Protein (Mi-1) which reacts with Anti-immunoglobulin Sera and the Sera of Patients with Dermatomyositis. *Mol. Immunol.* 17: 1129-1141, 1980.
10. Alspaugh, M.A., and Tan, E.M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration by Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 19:711-719, 1976.
11. Holden, D.J., Brownell, A.K.W., and Fritzler, M.J. Clinical and Serologic Features of Patients with Polymyositis or Dermatomyositis. *Can. Med. Assoc. J.* 132:649-653, 1985.
12. Hoy, E.S. Detection of Autoantibodies to the SSA/Ro Antigen: Comment on the Article by Boire et al (letter). *Arthritis Rheum.* 35:1109-1112, 1992.
13. Fritzler, M.J. and Tan, E.M. Antinuclear Antibodies and the Connective Tissue Diseases, p. 207-247. In Cohen, A.S. (ed.), *Laboratory Diagnostic Procedures in the Rheumatic Diseases (Third Edition)*. Grune and Stratton, Orlando, FL, 1985.
14. Tan, E.M. and Kunkel, H.G. Characteristics of a Soluble Nuclear Antigen Precipitating with Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 96:464-471, 1966.
15. Winfield, J.B., Brunner, C.M., and Koffler, D. Serological Studies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Central Nervous System Dysfunction. *Arthritis Rheum.* 21:289-294, 1978.
16. Nakamura, R.M. and Tan, E.M. Autoantibodies to Nonhistone Nuclear Antigens and Their Clinical Significance. *Hum. Pathol.* 14:392-400, 1983.
17. Hamburger, M., Hodes, S., and Barland, P. The Incidence and Clinical Significance of Antibodies to Extractable Nuclear Antigens. *Am. J. Med. Sci.* 273:21-28, 1977.
18. Lerner, M.R. and Steitz, J.A. Antibodies to Small Nuclear RNAs Complexed with Proteins are Produced by Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5495-5499, 1979.
19. Conner, G.E., Nelson, D., Wisniewolski, R., et al. Protein Antigens of the RNA-protein Complexes Detected by Anti-Sm and Anti-RNP Antibodies Found in Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Related Disorders. *J. Exp. Med.* 156:1475-1485, 1982.
20. Notman, D.D., Kurata, N., and Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Intern. Med.* 83:464-469, 1975.
21. Tan, E.M. Antinuclear Antibodies in Diagnosis and Management. *Hosp. Pract.* 18:78-84, 1983.
22. Clark, G., Reichlin, M., and Tomasi, T.B. Characterization of a Soluble Cytoplasmic Antigen Reactive with Sera from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 102:117-122, 1969.
23. Mattioli, M. and Reichlin, M. Heterogeneity of RNA Protein Antigens Reactive with Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 17:421-429, 1974.
24. Sontheimer, R.D., Maddison, P.J., Reichlin, M., et al. Serologic and HLA Associations in Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus, a Clinical Subset of Lupus Erythematosus. *Ann. Intern. Med.* 97:664-671, 1982.
25. Alexander, E.L., Arnett, F.C., Provost, T.T., et al. Sjögren's Syndrome: Association of Anti-Ro (SSA) Antibodies with Vasculitis, Hematologic Abnormalities, and Serologic Hyperreactivity. *Ann. Intern. Med.* 98:155-159, 1983.
26. Provost, T.T., Arnett, F.C., and Reichlin, M. Homozygous C2 Deficiency, Lupus Erythematosus, and Anti-Ro (SSA) Antibodies. *Arthritis Rheum.* 26:1279-1282, 1983.
27. Wasicek, C.A. and Reichlin, M. Clinical and Serological Differences Between Systemic Lupus Erythematosus Patients with Antibodies to Ro versus Patients with Antibodies to Ro and La. *J. Clin. Invest.* 69:835-843, 1982.
28. Maddison, P.J., Provost, T.T., and Reichlin, M. Serological Findings in Patients with "ANA Negative" Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine* 60:87-94, 1981.
29. Conrad, K., ed., *Autoantibodies in Systemic Autoimmune Disease – A Diagnostic Reference*, 2nd edition, Dresden, Pabst, 2007: 167-172.
30. Guldner, H.H., Szosteki, C., Vosberg, H.P., et al. Sci 70 Autoantibodies from Scleroderma Patients Recognize a 95 kDa Protein Identified as DNA Topoisomerase I. *Chromosoma* 94:132-138, 1986.
31. Jarzabek-Chorzelska, M., Blaszczyk, M., Jablonska, S., et al. Sci 70 Antibody-A Specific Marker of Systemic Sclerosis. *Brit. J. Dermatol.* 115:393-401, 1986.
32. Bernstein, R.M., Morgan, S.H., Chapman, J., et al. Anti-Jo-1 Antibody: A marker for Myositis with Interstitial Lung Disease. *Brit. Med. J.* 289:151-152, 1984.

Si l'emballage de protection est endommagé, veuillez contacter Immuno Concepts avant toute utilisation.



Constructeur



Représentant autorisé dans le Communauté européen



Limitation de la Température



Contient suffisamment pour <n> essais



Consultez les instructions pour l'usage



Dispositif Médical Diagnostique In vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

PROCÉDURE DE TEST DE DÉPISTAGE ENA À PUIITS UNIQUE RELISA®

Tous les échantillons, réactifs (y compris solution tampon de lavage) et micropuits doivent être à température ambiante avant utilisation.

1. PRÉPARATION DU FORMULAIRE

Étiqueter le formulaire inclus dans le kit afin d'indiquer l'emplacement des échantillons dans les micropuits. Procéder au dosage de l'étalon en double. Un puits est utilisé pour un blanc de réactif. Nous recommandons que chaque contrôle et échantillon de patient soit dosé en double jusqu'à ce que vous ayez établi une précision acceptable pour le dosage dans votre laboratoire.

2. PRÉPARATION DE LA SOLUTION TAMPON DE LAVAGE (PBS-Tween)

Dissoudre le contenu d'un sachet de tampon PBS dans un litre d'eau désionisée ou distillée. Ajouter tout le contenu d'une bouteille de concentré tampon de lavage au récipient d'un litre de PBS dissous. Bien mélanger. La solution tampon de lavage peut être couverte et conservée à 2-25°C pendant quatre semaines.

3. DILUTION DES ÉCHANTILLONS DES PATIENTS

Diluer les échantillons des patients à 1:40 en ajoutant 25 µl de sérum à 975 µl de diluant pour échantillon. Si vous utilisez le contrôle positif dosé non dilué ENA optionnel, le diluer de la même manière que les échantillons des patients. Bien mélanger. L'étalon, le contrôle positif et le contrôle négatif sont pré-dilués et ne doivent pas être dilués de nouveau.

4. PRÉPARATION DES MICROPUIITS

Sortir du sachet le nombre de barrettes nécessaires à la manipulation et les positionner sur le support. Les micropuits doivent être clipsés fermement sur le support. Pour ce faire, appuyer sur les deux extrémités des barrettes jusqu'à l'enclenchement sur le support. Si le test requiert moins de huit puits, ils peuvent être séparés par simple rupture. Si vous utilisez des puits isolés ou une barrette incomplète, veiller à ce que chaque puits soit correctement placé afin qu'il ne tombe pas lors du retournement du support. Conserver les barrettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet absorbant d'humidité, fermer hermétiquement, puis réfrigérer pendant 45 jours maximum.

5. DISTRIBUTION DES DILUTIONS SÉRIQUES

Déposer 100 µl d'étalons, de contrôles et d'échantillons de patient dilués dans les puits appropriés comme décrit sur le formulaire. Déposer 100 µl de diluant pour échantillon dans le puits du blanc de réactif.

6. INCUBATION DES BANDELETTES (30 minutes à température ambiante, soit 18-25°C)

Mettre à incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Les bandelettes doivent être protégées des courants d'air ou des variations de température pendant l'incubation. Recouvrir, le cas échéant, les bandelettes d'un film transparent ou d'une serviette en papier pour les protéger de la poussière ou d'autres corps étrangers.

7. LAVAGE DES BANDELETTES (voir Remarques générales relatives à la procédure 5 et 6):

Laver les puits 3 à 5 fois avec la solution tampon de lavage PBS-Tween. Pour le lavage manuel, aspirer le contenu des puits puis remplir ceux-ci de solution tampon de lavage. Éviter la contamination croisée des puits, en particulier lors du premier lavage suivant l'aspiration. Vider toute la solution tampon de lavage des puits en les renversant puis en les secouant d'un geste sec du poignet afin d'éliminer tout résidu. Répéter ces étapes (remplissage/élimination) jusqu'à effectuer 3 à 5 lavages au total. Frapper ensuite vigoureusement les puits sur une

serviette en papier ou une autre matière absorbante pour éliminer toute trace résiduelle de tampon de lavage.

8. DISTRIBUTION DU RÉACTIF IMMUNO-ENZYMATIQUE

Déposer 100 µl de réactif immuno-enzymatique dans chacun des puits.

9. INCUBATION DES BANDELETTES (30 minutes à température ambiante, soit 18-25°C)

Mettre à incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Les bandelettes doivent être protégées des courants d'air ou des variations de température pendant l'incubation. Recouvrir, le cas échéant, les bandelettes d'un film transparent ou d'une serviette en papier pour les protéger de la poussière ou d'autres corps étrangers.

10. LAVAGE DES BANDELETTES

Laver les puits 3 à 5 fois avec la solution tampon de lavage PBS-Tween. Pour le lavage manuel, aspirer le contenu des puits puis remplir ceux-ci de solution tampon de lavage. Éviter la contamination croisée des puits, en particulier lors du premier lavage suivant l'aspiration. Vider toute la solution tampon de lavage des puits en les renversant puis en les secouant d'un geste sec du poignet afin d'éliminer tout résidu. Répéter ces étapes (remplissage/élimination) jusqu'à effectuer 3 à 5 lavages au total. Frapper ensuite vigoureusement les puits sur une serviette en papier ou une autre matière absorbante pour éliminer toute trace résiduelle de tampon de lavage.

11. DISTRIBUTION DE LA SOLUTION DE SUBSTRAT

Utiliser un chronomètre pour respecter le minutage et déposer 100 µl de solution de substrat dans chacun des puits. La solution de substrat doit être ajoutée aux puits à un rythme constant, de manière à ce que l'incubation de chaque puits ait la même durée (30 minutes). La solution de substrat mise à incuber avec des échantillons positifs se colore en bleu et celle mise à incuber avec des échantillons négatifs variera d'incolore à bleu très pale.

12. INCUBATION DES BANDELETTES (exactement 30 minutes à température ambiante, soit 18-25°C)

Mettre à incuber à température ambiante pendant exactement 30 minutes. Les bandelettes doivent être protégées des courants d'air ou des variations de température pendant l'incubation.

13. DISTRIBUTION DU RÉACTIF D'ARRÊT

Après incubation du premier puits pendant exactement 30 minutes, ajouter 100 µl de réactif d'arrêt dans chaque puits, dans le même ordre et au même rythme que pour l'ajout de solution de substrat dans les puits. Dès l'ajout de réactif d'arrêt, la solution de substrat bleue devient jaune et la solution incolore demeure incolore.

14. LECTURE DE LA DENSITÉ OPTIQUE DES PUIITS

Dans les 30 minutes suivant l'ajout de réactif d'arrêt, les puits doivent être lus à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques. Les puits sont lus à 450 nm par rapport au puits de contrôle à blanc. Si un spectrophotomètre à double longueur d'onde est disponible, la longueur d'onde pour le filtre de référence doit être réglée sur 600-650 nm. La lecture des micropuits sans filtre de référence donne des valeurs de densité optique plus élevées.

POUR L'ASSISTANCE TECHNIQUE: +1-916-363-2649

ou messagerie électronique: technicalsupport@immunoconcepts.com