

## **TEST DE DÉPISTAGE DES ANTICORPS ANA RELISA®**

*Pour utilisation diagnostique in vitro*

*Pour l'Usage Professionnel*

*Référence catalogue: 7096-11 (96 puits) et 7696-11 (576 puits)*

*UTILISATION PRÉVUE: Il s'agit d'un système de test par immunodosage enzymatique pour la détection des anticorps anti-nucléaires dans le sérum humain. Ce système de test doit être utilisé comme une aide à la détection des anticorps associés aux maladies rhumatismales systémiques.*

### **RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST**

Anticorps anti-nucléaire (ANA) est un terme général utilisé pour décrire les auto-anticorps dirigés contre diverses protéines nucléaires. Les premières études portant sur ces auto-anticorps, à l'aide de techniques d'immunofluorescence, ont révélé quelques spécificités des protéines nucléaires (1). La corrélation entre la positivité des tests ANA et le lupus érythémateux disséminé (LED) étant très élevée, un test ANA négatif exclut, de fait, cette maladie (2).

Bien que la présence d'anticorps anti-ADN constitue toujours une forte présomption de LED (3), un certain nombre de macromolécules nucléaires (4) et cytoplasmiques (5-7) ont également été détectées et associées à d'autres collagénoses (8-10). Certains de ces anticorps ont une valeur diagnostique et/ou pronostique, notamment en cas de sclérodémie généralisée évolutive (11-12), de connectivité mixte (13-15), de syndrome de Sjögren (16-17), de polymyosite (18) et/ou de polyarthrite rhumatoïde (19). En raison de ces associations cliniques, les tests ANA sont maintenant reconnus comme un outil d'analyse général de la collagénose (20).

La méthode la plus courante pour tester les ANA est la méthode d'immunofluorescence indirecte (IFA) utilisant des cellules cultivées. La sensibilité de ces dosages varie en fonction du type de substrat utilisé, de la méthode de fixation et du type d'ANA présent dans le sérum. Le test IFA utilisant des cellules HEp-2 ou HEp-2000® est considéré comme un test sensible pour la détection des ANA. Cependant il requiert beaucoup de manipulations et peut faire l'objet d'erreurs liées à la variabilité des microscopes à fluorescence et de l'interprétation par l'homme.

Les immunodosages enzymatiques (EIA) constituent une solution de remplacement de la méthode IFA. Les systèmes de test EIA permettent d'analyser efficacement un grand nombre d'échantillons. Les erreurs humaines sont réduites et les résultats sont fournis de manière objective. Cependant, il a été montré que les méthodes EIA présentent des résultats à la fois faussement positifs et faussement négatifs par rapport aux méthodes IFA (21).

### **PRINCIPE DU TEST**

Ce test est un immunodosage enzymatique indirect qualitatif. Des antigènes stabilisés (ADN double brin, histones, SSA/Ro, SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centromères, PCNA, Ribosomal P, M2 et autres antigènes extraits du noyau et le cytoplasme HEp-2) ont été déposés 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 à l'antigène sur 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 conjugués 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, un complexe tripartite stable se forme 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-nucléaire 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> servant de substrat chromogène. Le degré de développement de la couleur dans chaque puits est proportionnel à la concentration en anticorps anti-nucléaires 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'antigène RELISA® **PLATE**:** Réf. catalogue 7008-11. Une microplaque contenant 12 barrettes de 8 puits recouvertes d'antigènes cellulaire (ADN double brin, histones, SSA/Ro, SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centromères, PCNA, Ribosomal P, M2 et autres antigènes extraits du noyau et le cytoplasme HEP-2). Le code couleur de ces barrettes est prune. 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 RELISA® **SOLN|DIL**:** Référence catalogue 7100 (100 ml). Diluant tamponné propriétaire, utilisé pour diluer les échantillons de patient.

**Réactif immuno-enzymatique RELISA® - Spécifique aux chaînes lourdes et légères d'IgG humaine **CONJ|HRP**:** Référence catalogue 7009-11 (14 ml). Anti-IgG humaine (chaînes lourdes et légères) conjuguée à de la peroxydase de raifort (HRP). Le réactif est prêt à l'emploi.

**Solution de substrat RELISA® **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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) stabilisés. Le réactif est prêt à l'emploi. **ATTENTION:** 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 RELISA® **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 ANA RELISA® **CAL**:** Référence catalogue 7026-11 (2 ml). Sérum humain qui contient des anticorps anti-nucléaires. La valeur de dosage de ce sérum est indiquée sur l'étiquette du flacon. Ce sérum est prédilué et prêt à l'emploi.

**Contrôle positif ANA RELISA® **CONTROL|+**:** Référence catalogue 7021-11 (2 ml). Sérum de contrôle positif humain qui contient des anticorps anti-nucléaires. Ce sérum est prédilué et prêt à l'emploi.

**Contrôle négatif ANA RELISA® **CONTROL|-**:** Référence catalogue 7031 (2 ml). Sérum de contrôle négatif humain qui ne contient pas d'anticorps anti-nucléaires. Ce sérum est prédilué et prêt à l'emploi.

**Contrôle positif non dilué ANA optionnel RELISA® **OPT+**:** Référence catalogue 7022-11 (0,25 ml). Sérum de contrôle positif humain qui contient des anticorps anti-nucléaires. 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 en poudre tamponnée au phosphate (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Chaque sachet contient une quantité suffisante de poudre tampon pour préparer 1 litre de solution. (Chaque kit de test 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 kit de test complet contient deux flacons de concentré tampon pour chaque plateau de 96 micropuits.)

**Préparation:** Dissoudre un sachet de poudre tampon dans 1 litre d'eau désionisée ou distillée. Ajouter tout le contenu d'une bouteille de concentré tampon de lavage au tampon 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 de 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 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. La dilution des composants ou l'utilisation de composants autres que ceux fournis dans ce kit peut donner lieu à des résultats incohérents.
4. L'azide de sodium (0,09%) est utilisé comme conservateur. Il est possible que l'azide de sodium réagisse au contact des canalisations en plomb ou en cuivre et forme des sels d'azides métalliques 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.
5. Ce kit est destiné à une utilisation diagnostique *in vitro*.
6. 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.
7. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
8. Éviter toute éclaboussure ou pulvérisation d'aérosols à tout moment.
9. Les durées et températures d'incubation autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés.
10. La contamination croisée des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats. Pendant le test, les échantillons doivent rester confinés dans les micropuits.
11. 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.
12. Avant utilisation, porter les réactifs, micropuits et échantillons à température ambiante (18-25°C).

13. Mettre des gants jetables pour manipuler les échantillons et les réactifs puis se laver soigneusement les mains en fin de procédure technique.
14. La contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
15. 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'ÉCHANTILLIONS

**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.

**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 GÉNÉRALES RELATIVES À LA PROCÉDURE

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 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.
2. Avant utilisation, bien mélanger les réactifs en retournant doucement les flacons. 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 déposer 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 répartition 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 non homogène 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 que l'échantillon ou le réactif est déposé. 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:

$$\frac{U_c \times \lambda_s}{\lambda_c} = U_s$$

$U_c$  = Valeur étalon (unités)

$\lambda_c$  = Densité optique de l'étalon\*

$\lambda_s$  = Densité optique de l'échantillon\*

$U_s$  = 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 doubles de puits 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. Porter tous les réactifs à température ambiante (18-25°C) et recommencer 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 autre 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 anti-nucléaires. Il s'agit d'un contrôle qualitatif qui doit donner une valeur supérieure à 15 unités ANA.
7. Le sérum de contrôle négatif est un pool de sérum humain qui ne contient pas d'anticorps anti-nucléaires. Ce contrôle doit donner des valeurs inférieures à 10 unités ANA.
8. Le sérum de contrôle positif non dilué est un sérum humain qui contient des anticorps anti-nucléaires. Ce contrôle doit donner une valeur supérieure à 15 unités ANA.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU PATIENT

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 15 unités ANA sont considérés comme positifs et doivent être testés à l'aide d'un dosage constitué de lames HEp-2 ou HEp-2000<sup>®</sup> afin de déterminer les motifs fluorescents ANA, et faire l'objet de tests de suivi. Les puits d'échantillon de patient dont les valeurs sont inférieures à 10 unités ANA sont considérés comme négatifs. Les valeurs comprises entre 10 et 15 unités sont considérées comme à la limite du positif; les dosages doivent être recommencés ou ces valeurs testées à l'aide d'un dosage constitué de lames HEp-2 ou HEp-2000<sup>®</sup> afin de déterminer les motifs fluorescents ANA, et faire l'objet de tests de suivi. 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 minutage des étapes).

## COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Les résultats doivent être notés positifs ou négatifs aux anticorps anti-nucléaires. 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 de la détection des anticorps anti-nucléaires 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-nucléaires. 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 médicaments (procaïnamide, hydralazine...) peuvent provoquer des pathologies similaires au lupus érythémateux (22). Les patients souffrant de lupus érythémateux induit par des médicaments peuvent présenter des ANA positifs.
4. Bien qu'un ANA à titrage élevé fasse indéniablement penser à une collagénose, il ne doit pas être considéré comme un élément diagnostique mais plutôt comme faisant partie des antécédents cliniques d'un patient.
5. On note la présence d'un certain nombre d'ANA positifs chez un faible pourcentage de patients développant des néoplasmes et/ou des infections (9).

## VALEURS ESCOMPTÉES

L'incidence des auto-anticorps dirigés contre divers antigènes nucléaires varie en fonction de la population de patients étudiée et l'incidence des maladies rhumatismales cliniques dans cette population. À l'aide de la technique d'immunofluorescence indirecte avec cellules HEp-2, les anticorps anti-nucléaires ont été détectés chez 95% des patients présentant un lupus érythémateux disséminé, chez 90% des patients atteints de lupus induit par des médicaments, chez 95% des patients souffrant de connectivité mixte, chez 80% des patients présentant un syndrome de Sjögren et chez 90% des patients atteints de sclérodermie (23).

## PERFORMANCES

Le système de test ANA RELISA<sup>®</sup> d'Immuno Concepts a été comparé à un autre kit de test des anticorps anti-nucléaires ELISA disponible sur le marché. La population étudiée comprenait 579 échantillons soumis à un grand centre hospitalier universitaire pour le test des anticorps anti-nucléaires, 90 échantillons dont la positivité ANA était connue, ainsi que des échantillons de donneurs de sang (242 échantillons de femmes et 261 échantillons d'hommes). Tous les échantillons ont été testés en parallèle, sur le dispositif équivalent et sur le dispositif étudié. Cette comparaison a permis d'obtenir les données suivantes:

IC Test d'anticorps antinucléaires RELISA <sup>®</sup>	Dispositif équivalent	
	Positif	Négatif
Positif	214	46
Limite	12	105
Négatif	8	787

Les résultats limites sont considérés comme positifs. Ces données présentent un agrément total de 85,4%.

Le grand nombre d'échantillons «faussement positifs» observés avec le test Immuno Concepts était troublant; nous avons donc testé les anticorps anti-nucléaires de l'ensemble de ces sérums à l'aide du système de test ANA-Ro HEp-2000<sup>®</sup> d'Immuno Concepts. Il a été démontré que soixante-dix neuf de ces échantillons «faussement positifs» avaient des images ANA clairement visibles avec la technique d'immunofluorescence indirecte et étaient considérés comme «réellement positifs» en termes de détection des anticorps anti-nucléaires. Il a été démontré que quatre des échantillons «faussement négatifs» étaient négatifs via la technique d'immunofluorescence indirecte et étaient considérés comme «réellement négatifs» en termes de détection des anticorps anti-nucléaires. Par conséquent, lorsque la méthode de référence est prise en compte, la comparaison ressemble à ceci:

IC Test d'anticorps antinucléaires RELISA <sup>®</sup>	Méthode de référence	
	Positif	Négatif
Positif	305	72
Négatif	4	791

Ces données présentent un agrément total de 93,5%.

## REPRODUCTIBILITÉ

Neuf échantillons positifs, deux échantillons limites et cinq échantillons négatifs ont été traités sur trois numéros de lot différents de bandelettes de micropuits enduites d'antigènes, à plusieurs occasions, par différents techniciens. En aucun cas un échantillon négatif n'a donné de résultats positifs et les échantillons positifs ont systématiquement donné des résultats clairement positifs. Les échantillons limites variaient entre négatifs et limites.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Robbins, W.C., Holman, H.R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. California Medicine 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D. Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. J. Immunol. 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. Ann. Rheum. Dis. 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. Hum. Pathol. 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. Semin. Arthritis Rheum. 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. Biol. Chem. 245:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzier, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleo-protein. Ann. Rheum. Dis. 38:74-78, 1979.
14. 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). Am. J. Med. 52:148-159, 1972.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, L. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. N. Engl. J. Med. 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. J. Clin. Invest. 55:1067-1073, 1975.
17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. Arthritis Rheum. 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. J. Clin. Invest. 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. Arthritis Rheum. 19:711-719, 1976.
20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
21. Emlen, W., O'Neill, L. Clinical Significance of Antinuclear Antibodies (ANA): Comparison of Detection with Immunofluorescence and Enzyme-linked Immunosorbent Assays. Arthritis Rheum. 40:1612-1618, 1997.
22. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. Arch. Int. Med 117:620-626, 1966.
23. von Mühlen, C.A., Tan, E.M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. Semin. Arthritis Rheum. 24:323-358, 1995.

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](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

# PROCÉDURE DE TEST ANA 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 ANA 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 MICROPUITS**  
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'étalon, de contrôle et d'échantillon 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 pâle.
- 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