

ENA-LISA

REF **HM 008**


12 x 8 tests

DÉFINITION

Le coffret **ENA-LISA** permet le dosage par méthode ELISA des auto-anticorps correspondant aux spécificités suivantes : SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, Sm/RNP, Scl-70 et Jo-1.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

La recherche et la caractérisation des anticorps anti-ENA (Extractable Nuclear Antigens) constituent pour le clinicien un élément important pour le diagnostic et la classification des sous-groupes de connectivites. Des études sérologiques de plus en plus complètes ont permis de mettre en évidence des associations significatives entre certains anti-ENA et certaines maladies :

Anticorps associés à une entité clinique

- **Anticorps anti-SS-A et anti-SS-B**
De façon associée ou non, ils sont observés dans les mêmes circonstances pathologiques : Syndrome de Gougerot-Sjögren, ou syndrome sec, et dans le Lupus Erythémateux Systémique (LES). L'anti-SS-A est également retrouvé chez les mères d'enfant ayant présenté un bloc auriculo-ventriculaire néonatal.
- **Anticorps anti-RNP**
On le retrouve surtout dans les connectivites mixtes, ou Syndrome de Sharp, dont il constitue le marqueur biologique. Il est également observé dans le LED.

Anticorps spécifiques d'une connectivite précise

- **Anticorps anti-Sm** caractéristique des formes graves de LED.
- **Anticorps anti-Scl-70** spécifique de la sclérodémie proximale diffuse.
- **Anticorps anti-Jo-1** retrouvé exclusivement chez les malades atteints de Polymyosite.

ECHANTILLONS

- Le dosage d'anticorps peut être effectué sur sérum.
- Eviter d'utiliser des sérums lipémiques, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus de 1 fois.
- Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 7 jours maximum, sinon congelés.
- Afin de limiter toute fixation non spécifique, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

PRINCIPE DU TEST

Les différents antigènes nucléaires solubles sont adsorbés sur un support solide constitué de 12 barrettes de 8 micropuits en plastique.

- Dans un premier temps, l'échantillon à tester est dilué puis mis à incuber dans les puits de la microplaque. S'il contient au moins l'une des spécificités recherchées, les auto-anticorps impliqués vont se fixer à un ou plusieurs antigènes correspondants. Après incubation, les anticorps non fixés sont éliminés par lavage.

- On ajoute ensuite un conjugué monoclonal de souris anti-IgG humaine couplé à la peroxydase de Raifort qui se fixe au complexe Antigène-Anticorps précédemment formé. Après incubation, l'excès de conjugué est éliminé par un second lavage.
- L'étape de chromogénèse est réalisée en déposant le substrat de l'enzyme: ABTS (2,2 Azino-di-[3-sulfonate déthyl benzthiazoline]). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon.
- L'addition de H₂SO₄ (0.25 M) permet de bloquer la réaction enzymatique.
- La lecture des densités optiques à 405 nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.
- Un système de calibration, en unités arbitraires, permet, par interpolation, de définir le titre de l'échantillon.

COMPOSITION DU COFFRET

Une microplaque de 12 barrettes amovibles, sensibilisés par différents antigènes nucléaires solubles. (*)	MP	12 barrettes
Un flacon de Calibrateur titré en unités arbitraires pour les 6 spécificités (voir chapitre « Résultats ») Prêt à l'emploi	CAL n	1 x 1,5ml
Un flacon de Conjugué anti-IgG humaine couplée à la peroxydase Prêt à l'emploi.	CONJ IgG	1 x 15ml
Un flacon de Tampon Phosphate-Tween pH 7,2 (concentré 10x) - A reconstituer en eau distillé	BUF WASH 10x	1 x 100ml
Un flacon de Substrat (ABTS) Prêt à l'emploi	SUBS ABTS	1 x 15ml
Un flacon de Solution d'arrêt H ₂ SO ₄ (0.25 M) Prêt à l'emploi	SOLN STOP	1 x 15ml

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Eau distillée
- Pipettes de précision
- Lecteur muni d'un filtre 405 nm
- Peigne de lavage 8 canaux.

(*) L'identification des puits est réalisée de façon suivante :

Puits	Couleur	Spécificité	Dépôt
A	transparent	blanc réactif	Tampon de dilution
B	rouge	calibrateur	Calibrateur titré
C	bleu	SS-A	échantillons dilués
D	jaune	SS-B	échantillons dilués
E	vert	Sm	échantillons dilués
F	orange	Sm/RNP*	échantillons dilués
G	blanc	Scl-70	échantillons dilués
H	noir	Jo-1	échantillons dilués

(*) A tester en parallèle avec l'antigène Sm pour la détection des anticorps anti-RNP.

La recherche, chez un même patient, des 6 spécificités, s'effectue à l'aide d'une barrette complète (puits A1 à H1 par exemple).

Pour la recherche, chez un ou plusieurs patients, de certaines spécificités, extraire le nombre de puits correspondant à chacune, ainsi que deux puits, A et B. Remplacer les puits sélectionnés dans leur support plastique.

STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs et les barrettes de puits sensibilisés doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Après la première ouverture, conserver les barrettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet déshydratant et les remettre immédiatement entre +2°C et +8°C.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

L'ensemble des réactifs doit être préparé extemporanément.

1. Tampon de dilution et de lavage (TDL)

- Diluer le Tampon Phosphate-Tween concentré au 1/10 en eau distillée.
- Durée de conservation : 3 mois entre +2°C et +8°C (ne plus utiliser si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent)

Remarque : En présence de cristaux dans la solution concentrée, placer le flacon 15 min. à +37°C avant utilisation.

2. Préparation des échantillons

- Les diluer au 1/101 en tampon TDL (10µl + 1ml de TDL).
- Agiter vigoureusement au vortex.

3. Utilisation du conjugué - prêt à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et le transférer dans un tube à partir duquel se fera le dépôt.

4. Utilisation du substrat - prêt à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et le transférer dans un tube à partir duquel se fera le dépôt.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Retirer tous les réactifs hors de leur logement de conditionnement et les ramener impérativement à température ambiante (+18°C / +25°C) au minimum une demi-heure avant de commencer le dosage.

La température des réactifs peut influencer le résultat final. S'assurer que les plaques soient bien égouttées après chaque lavage.

Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.

Le calibrateur est d'origine humaine. Les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2, anti-HCV et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.

Les réactifs en solutions (excepté la solution d'arrêt) contiennent comme agent de conservation, de l'azide de sodium à une concentration <0.1% (w/v) ou du ProClin® 300 à 0.02% (w/v). Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs lors de son élimination dans les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

Le coffret **ENA-LISA** a été élaboré dans le respect des Directives européennes 67/548/CEE et 1999/45/CE en ce qui concerne la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses.

ENA-LISA a été optimisé pour les conditions opératoires précisées dans cette notice. Le non-respect des dilutions, de la préparation des réactifs, du protocole ou la substitution d'un réactif par un autre produit peuvent affecter les performances finales du test.

MODE OPÉRATOIRE

1. Préparation du test

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

Pour chaque essai, prévoir :

- un puits « blanc réactif »
- un puits « calibrateur »
- un puits par spécificité

2. Incubation du calibrateur et des échantillons

Déposer 100µl de TDL dans les puits A

Déposer 100µl de calibrateur dans les puits B

Déposer 100µl d'échantillon dilué dans les puits correspondant aux spécificités recherchées (puits C à H)

Laisser incuber 30 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300µl/puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

3. Incubation du Conjugué

Déposer 100µl de conjugué prêt à l'emploi dans tous les puits

Incuber 30 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300µl/puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

4. Incubation du Substrat

Déposer 100µl de substrat dans chaque puits.

Incuber 30 minutes à température ambiante.

5. Arrêt de la réaction

Ajouter 100µl de H2SO4 (0.25 M) dans chaque puits.

6. Lecture

Lire la densité optique de chaque puits avec un lecteur de microplaques muni d'un filtre 405nm au cours des 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction.

Faire le zéro de l'appareil sur le puits "blanc réactif".

RÉSULTATS

- La densité optique (DO) du calibrateur doit être au moins égale à 0.8.

- Calculer le facteur de conversion pour chaque spécificité égal à:

Titre du calibrateur (U-SS-A, U-SS-B, U-Sm...) / DO du calibrateur

- Multiplier la DO de chaque puits échantillon par le facteur correspondant. En déduire le titre en auto-anticorps anti-ENA recherché.

Exemple de calcul :

Pour un calibrateur titré à 60 U-SS-A, et donnant une DO de 1.25, le facteur de conversion SS-A est égal à 60/1.25, soit 48.

A un échantillon de DO 0.5 (puits SS-A) correspond un titre de 0.5 x 48, soit 24 U-SS-A.

INTERPRÉTATION DES RESULTATS

Unités Arbitraires	< 30	30 - 40	> 40
Résultats	Négatif	Limite *	Positif **

* Les résultats limites doivent être contrôlés sur un second prélèvement quelques semaines plus tard et interprétés en fonction d'examen complémentaires et du contexte clinique.

** La linéarité de la réponse antigène-anticorps anti-ENA est optimale pour des titres n'exédant pas la valeur du calibrateur. Au-delà, elle peut, selon les conditions réactionnelles (telles que la température), ne plus être suffisante pour assurer précision et reproductibilité des résultats. Ceux-ci devront, par conséquent, être exprimés : "supérieurs à 100 unités".

LIMITES

Du fait des différences qui peuvent exister entre les laboratoires et les régions en rapport avec la population, l'alimentation, les techniques du laboratoire et la sélection des groupes de référence, il est important pour chaque laboratoire d'établir la validité des valeurs de référence suggérées ci-dessus.

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

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Si plus de 4 spécificités sont retrouvées chez un même patient (ex : SS-A – SS-B – Sm/RNP – Scl-70), il est conseillé de contrôler le prélèvement par une autre méthode.

bmd propose des contrôles multiparamétriques externes qui peuvent être testés en parallèle. Le contrôle Immuno-Trol IV (réf : HM051) lequel renferme des anticorps anti-SS-A, SS-B, Sm et Sm/RNP et le contrôle Immuno-Trol V (réf : HM052) lequel renferme des anticorps anti-Scl-70 et anti-Jo1. Ils sont à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

1. SENSIBILITÉ, SPÉCIFICITÉ ET CONCORDANCE PAR RAPPORT AUX AUTRES MÉTHODES

Le test **ENA-LISA** a été comparé à six tests ELISA commercialisés.

L'étude a porté sur 338 échantillons (pour SS-A, SS-B, Sm/RNP, Scl-70 et Jo-1) et 368 échantillons (pour Sm).

⇒ 212 échantillons positifs (pour SS-A, SS-B, RNP, Scl-70 et Jo-1) et 240 échantillons positif (pour Sm) ont été sélectionnés car ils présentaient au moins un type d'anticorps anti-ENA par la méthode de référence

⇒ 126 échantillons négatifs (pour SS-A, SS-B, RNP, Scl-70 et Jo-1) et 128 échantillons négatif (pour Sm) ont été sélectionnées car ils ne présentaient aucun anticorps anti-ENA par la méthode de référence.

Résultats

SS-A		ELISA de référence		SS-B		ELISA de référence	
		Positif	Négatif			Positif	Négatif
ENA-LISA	Positif	103	5	ENA-LISA	Positif	63	19
	Négatif	4	226		Négatif	4	252

Sm		ELISA de référence		Sm/RNP		ELISA de référence	
		Positif	Négatif			Positif	Négatif
ENA-LISA	Positif	51	18	ENA-LISA	Positif	69	18
	Négatif	13	286		Négatif	10	241

Scl-70		ELISA de référence		Jo-1		ELISA de référence	
		Positif	Négatif			Positive	Negative
ENA-LISA	Positif	26	6	ENA-LISA	Positif	31	7
	Négatif	1	305		Négatif	0	300

Performances sur la population étudiée

Spécificité antigénique	Sensibilité relative (%)	Spécificité relative (%)	Concordance (%)
SS-A	96 (103/107)	98 (226/231)	97 (329/338)
SS-B	94 (63/67)	93 (252/271)	93 (315/338)
Sm	80 (51/64)	94 (286/304)	92 (337/368)
Sm/RNP	87 (69/79)	93 (241/259)	92 (310/338)
Scl-70	93 (26/27)	98 (305/311)	98 (331/338)
Jo-1	100 (31/31)	98 (300/307)	98 (331/338)

2. PRECISION

Spécificité antigénique	Répétabilité (10 tests dans le même essai)		Reproductibilité (4 tests dans 6 essais différents)	
	Valeur moyenne	CV (%)	Valeur moyenne	CV (%)
SS-A	55	5	59.6	15
SS-B	52	5	62.5	10
Sm	63	4	78.3	9
Sm/RNP	124	5	155.4	7
Scl-70	130.5	4	144.9	14
Jo-1	91.1	4	99.7	7

BIBLIOGRAPHIE

ABUAF N., JOHANET C. Nouvelles perspectives dans les techniques de dépistage des auto-anticorps. Feuil. Biol. 1989; 30, 47-54.

HANS L.P. et al. A comparison of ELISA aSS-Ays as routine diagnostic test for detection of autoantibodies against extractable nuclear antigens. Clin. Biochem., 32, 3, 179-183, 1999.

HERVE L., ANDRE C. Evaluation d'une technique ELISA pour la détection des anticorps anti-SS-A/Ro. Comparaison avec la technique de référence. Anticorps anti-SS-A/Ro. Méthodes de dépistage et valeur diagnostique. Hôpital Rothschild - 4 octobre 1996. bmd Edition 1996; 75-82.

HOLLINGSWORTH PN et al. Antinuclear antibodies. Autoantibodies. Peter JB and Shoenfeld Y, editors. Ed Elsevier 1996, 74-90.

KEECH CL et al. SS-B (La) autoantibodies. Autoantibodies. Peter JB and Shoenfeld Y, editors. Ed Elsevier 1996, 789-797.

MONIER J.C. et al. Antinuclear antibodies : detection and diagnostic value. Nucl. Med. Biol. 1990; 17,7, 713-718.

SIBILIA et al. Signification clinique et biologique des anticorps anti-Ro/SS-A. Etude et suivi d'un groupe de 127 patients avec anticorps anti-Ro-SS-A. Anticorps anti-SS-A/Ro. Méthodes de dépistage et valeur diagnostique. Hôpital Rothschild - 4 octobre 1996. bmd Edition 1996, 91-112.

SONTHEIMER et al. Antinuclear Antibodies: clinical correlations and biological significance. Adv. Dermatol. 1992; 7, 3-52.

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	QUANTITÉ À DISTRIBUER	REACTIFS	CONDITIONS D'INCUBATIONS
INCUBATION	100µl 100µl 100µl	Tampon TDL : puits A Calibrateur : puits B Echantillons dilués : puits C à H	30 mn à température ambiante
LAVAGE	Laver 3 fois en tampon de dilution et de lavage (300µl/puits)		
⚠ Eliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant			
ETAPE DU CONJUGUÉ	100µl	Anti-h IgG PEROX prêt à l'emploi	30 mn à température ambiante
LAVAGE	Laver 3 fois en tampon de dilution et de lavage (300µl/puits)		
⚠ Eliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant			
RÉACTION ENZYMATIQUE	100µl	Solution substrat ABTS	30 mn à température ambiante
ARRÊT DE LA RÉACTION	100µl	Solution d'arrêt H ₂ SO ₄ (0.25M)	

INDEX DES SYMBOLES



Déclaration de conformité CE



Test ELISA



Dispositif de Diagnostic *In Vitro*



Référence produit



Numéro de Lot



Date d'expiration



Nombre de tests



Consulter les instructions d'utilisation



Limites de température



Risque biologique



Contient de l'azide de sodium



A reconstituer

BioMédical Diagnostics SA

Siège social

Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tél : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com



ENA-LISA

REF **HM 008**



12 x 8 tests

DEFINITION

E.N.A.-LISA is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for specific detection of human antibodies directed against: SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, Sm/RNP, Scl-70 and Jo-1.

DIAGNOSTIC VALUE

The detection and characterisation of anti-ENA (Extractable Nuclear Antigens) antibodies are an important element for the clinician in the diagnosis and classification of sub-groups of connective tissue diseases.

Antibodies associated with different autoimmune pathologies

- **Anti-SS-A and anti-SS-B antibodies**
Either one or both of these are observed, in the same pathological conditions Sjögren's syndrome and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) (6). Anti-SSA are also found in mothers who are carrying a baby with neonatal lupus syndrome including heart block.
- **Anti-RNP antibody**
Found primarily in Mixed Connective Tissue Disease or Sharp's Syndrome, for which they are the biological marker. They are also observed in SLE.

Specific antibodies for a single connective tissue disease

- **Anti-Sm antibodies** characterize severe forms of SLE.
- **Anti-Scl70 antibodies** are specific for diffuse Scleroderma.
- **Anti-Jo1 antibodies** are found exclusively in sera from patients suffering from Polymyositis.

SAMPLES COLLECTION AND HANDLING

- The test should be performed on serum.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- If determination is not performed immediately, samples should be stored at +2°C/+8°C for no longer than a week or frozen.
- To avoid any non-specific fixation, samples which have been frozen for more than 6 months or which are cloudy, should be centrifuged and filtered.

ASSAY PRINCIPLE

Each different extractable nuclear antigen is coated on to specific coloured wells of a polystyrene microtiter plate (12 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the coated well for each specific antigen, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.

- Then, a murine monoclonal anti-human IgG conjugated to horseradish peroxidase is added to each of the wells. The conjugate binds to the antigen-antibody complex. After incubation, the excess conjugate is removed by a second wash.
- The chromogenic step is performed by the addition of substrate ABTS (2,2 Azino-di-[3-sulfonate déthyl benzthiazoline]). During this step, a colour will develop in proportion to the amount of antibodies in the sample.
- Addition of Stop Solution H₂SO₄ (0.25 M) serves to stop the enzymatic reaction.
- After stopping the reaction by H₂SO₄ (0.25M), the optical density is read by a spectrophotometer at 405nm
- A calibration device allows to expressed in arbitrary units the titre of anti-ENA autoantibodies in samples patients.

REAGENTS

Microplate coated with Extractable Nuclear Antigens (12x8 individual breakaway wells). (*)	MP	12 strips
1 vial of Calibrator tittered in arbitrary units for 6 suspected specificities to be measured.	CAL n	1 x 1,5mL
Ready to use Each specificity value is shown on the vial label.		
1 vial of Anti-human IgG conjugated to peroxidase	CONJ IgG	1 x 15mL
Ready to use.		
1 vial of Phosphate-Tween buffer pH 7,2 (concentrated 10x) To dilute in distilled water	BUF WASH 10x	1 x 100mL
1 vial of Substrat solution (ABTS)	SUBS ABTS	1 x 15mL
Ready to use		
1 vial of Stop solution H ₂ SO ₄ (0.25M)	SOLN STOP	1 x 15mL
Ready to use		

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- distilled water
- precision pipettes
- microplate spectrophotometer with 405 nm filter
- 8 channel pipettes

(*) Identification of the wells is as following:

Wells	Colour	Specificity	Sample identification
A	clear	Blank reagent	Dilution buffer
B	red	calibrator	Calibrator
C	blue	SS-A	Diluted sample
D	yellow	SS-B	Diluted sample
E	green	Sm	Diluted sample
F	orange	Sm/RNP*	Diluted sample
G	white	Scl-70	Diluted sample
H	black	Jo-1	Diluted sample

(*) To test in parallel with the antigen Sm for the detection of the anti-RNP antibodies.

Determination of the 6 specificities, for a same patient, is carried out using a complete strip (A1 well to H1 well for example).

Determination of several specificities, for one or more patients: extract the number of wells corresponding to each one and two wells, A and B. Return unused strips into their plastic bag.

STABILITY AND STORAGE

- Store reagents and assay strips at +2°C/+8°C in their own package.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- Store unused strips into their plastic bag with the desiccant.
- Store all components immediately after use again at +2°C/+8°C.

SETUP

All the reagents should be prepared as required:

1. Dilution and washing buffer.

- Dilute concentrated Phosphate-Tween Buffer 1/10 in distilled water.
- Storage period: 3 months at +2°C/+8°C (avoid to use if signs of contamination or other visible changes occur)

NB. If there are crystals in the concentrated solution, warm the bottle to +37°C for 15 minutes before use.

2. Preparation of samples

- Dilute the samples at 1/101 in dilution buffer (10µL sample + 1mL dilution buffer).
- Vortex vigorously.

3. Use of ready-to-use conjugate.

- Estimate amount required for handling and transfer to a tube.

4. Use of ready-to-use substrate.

- Estimate amount required for handling and transfer to a tube.

PRECAUTIONS

Place all reagents outside of their packaging location. They must be necessarily returned to ambient temperature (+18°C/+25°C) at least one half an hour before beginning the test.

⚠ The temperature of the reagents could disturb the final result.

Check that all plates are well drained after each wash.

Avoid to use reagents if signs of contamination or other visible changes occur.

Human sources for the preparation of standards have been tested and found negative for antibody to HIV 1 and 2, antibody to hepatitis C virus and hepatitis B virus antigen. Nevertheless, no test can offer complete assurance that HIV, hepatitis B virus or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled as potentially infective materials.

Reagents in solution (except for substrate buffer and stop solution) contain less than 0.1% (w/v) sodium azide and 0.02% (w/v) of Proclin® 300. Do not eat and avoid contact with skin and eyes. Azide can form explosive mixtures with copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.

ENA-LISA has been developed according to CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labeling of dangerous preparations.

ENA-LISA has been optimized for the use as described in this procedure. Do not substitute other manufacturer's reagents. Dilution or adulteration of these reagents may also affect the performance of the test. Close adherence to the test procedure will assure optimal performance.

METHOD

1. Preparing the test

Use the work sheet to note the sample locations, set out:

- one blank reagent well (made up with dilution buffer)
- 1 well for calibrator
- 1 well for each specificity and each patient

2. Calibrator and Sample incubation

Add 100µL of dilution buffer in the well A

Add 100µL of diluted calibrator in the well B

Add 100µL of diluted sample in the wells corresponding to required specificities: wells C to H

Incubate for 30 minutes at room temperature.

Wash step:

Remove the contents of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300µL of washing and dilution buffer.

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess liquid.

3. Incubation of conjugate

Add 100µL of conjugate into each well

Incubate for 30 minutes at room temperature.

Wash step:

Remove the contents of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300µL of washing and dilution buffer.

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess liquid.

4. Incubation of substrate

Add 100µL substrate into each well.
Incubate for 30 minutes at room temperature.

5. Stop reaction

Add 100µL of H₂SO₄ (0,25M) to each well.

6. Reading

Read the optical density of each well at 405 nm against the reagent blank set at zero absorbance within 30 minutes.

RESULTS

- OD for the calibrator should be at least 0.8.
- Calculate the conversion factor for each specificity: **Calibrator value (U-SS-A, U-SS-B, U-Sm...)/ calibrator OD**
- Multiply OD of each well sample by the corresponding factor and deduce the required anti-ENA autoantibody titre.

Sample calculation:

For a calibrator titrated to 60 U-SS-A, showing an OD of 1.25, the SS-A conversion factor equals 60/1.25, which is 48.

A sample with OD 0.5 (well SS-A) has a titre of 0.5 x 48, which is 24 U-SS-A.

INTERPRETATION OF RESULTS

Arbitrary Units	< 30	30 - 40	> 40
Results	Negative	Borderline *	Positive **

* Borderline results should be controled on a second sample taken several weeks later and interpreted in the light of complementary examination and the clinical context.

** Linearity of the anti-ENA antibody-antigen response is optimal for titres which do not exceed the value of the calibrator. Above this, accuracy and reproducibility of results can be affected particularly by reaction conditions (such as temperature). Therefore results should be expressed as "over 100 units".

LIMITS

Because of differences which may exist between laboratories and locations with respect to population, diet, laboratory technique and selection of reference groups, it is importante for each laboratory to establish the validity of the above suggested range.

Hemolytic, lipemic, icteric samples or samples with abnormal concentration of IgG and/or complement levels or samples with rheumatoid factor may confound the results of this assay.

QUALITY CONTROL

If 4 or more specificities are found with the same patient (example: SS-A – SS-B - Sm/RNP - Scl-70), it is recommended to control this sample with an other method.

bmd offers external multiparameter quality controls ; Immuno-Trol IV control (Cat. No: HM051) which contains antibodies directed against SS-A, SS-B, Sm and Sm/RNP and the Immuno-Trol V control (Cat. No: HM052) which contains antibodies directed against Scl-70 and Jo1. These controls should be handled as samples.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCE OF THE TEST

1. SENSITIVITY, SPECIFIC AFFINITY AND AGREEMENT WITH ANOTHER METHOD

The ENA-LISA test was compared with six reference methods.

The study involved 338 samples (for SS-A, SS-B, Sm/RNP, Scl-70 and Jo-1) and 368 samples (for Sm)

⇒ 212 positive samples (for SS-A, SS-B, Sm/RNP, Scl-70 and Jo-1) and 240 positive samples (for Sm) with at least one anti-ENA antibody

⇒ 126 negative samples (for SS-A, SS-B, Sm/RNP, Scl-70 and Jo-1) and 128 negative samples (for Sm) for which any anti-ENA antibody was detected by the reference method.

Results

SS-A		Reference ELISA		SS-B		Reference ELISA	
		Positive	Negative			Positive	Negative
ENA-LISA	Positive	103	5	ENA-LISA	Positive	63	19
	Negative	4	226		Negative	4	252

Sm		Reference ELISA		Sm/RNP		Reference ELISA	
		Positive	Negative			Positive	Negative
ENA-LISA	Positive	51	18	ENA-LISA	Positive	69	18
	Negative	13	286		Negative	10	241

Scl-70		Reference ELISA		Jo-1		Reference ELISA	
		Positive	Negative			Positive	Negative
ENA-LISA	Positive	26	6	ENA-LISA	Positive	31	7
	Negative	1	305		Negative	0	300

Performances

Antigenic specificity	Relative sensitivity (%)	Relative specificity (%)	Concordance (%)
SS-A	96 (103/107)	98 (226/231)	97 (329/338)
SS-B	94 (63/67)	93 (252/271)	93 (315/338)
Sm	80 (51/64)	94 (286/304)	92 (337/368)
Sm/RNP	87 (69/79)	93 (241/259)	92 (310/338)
Scl-70	93 (26/27)	98 (305/311)	98 (331/338)
Jo-1	100 (31/31)	98 (300/307)	98 (331/338)

2. PRECISION

Antigenic specificity	Within-run (10 tests in the same run)		Between-run (4 tests in 6 different runs)	
	Mean values	CV (%)	Mean values	CV (%)
SS-A	55	5	59.6	15
SS-B	52	5	62.5	10
Sm	63	4	78.3	9
Sm/RNP	124	5	155.4	7
Scl-70	130.5	4	144.9	14
Jo-1	91.1	4	99.7	7

REFERENCES

ABUAF N., JOHANET C. Nouvelles perspectives dans les techniques de dépistage des auto-anticorps. Feuil. Biol. 1989; 30, 47-54.

HANS L.P. et al. A comparison of ELISA aSS-Ays as routine diagnostic test for detection of autoantibodies against extractable nuclear antigens.

Clin. Biochem., 32, 3, 179-183, 1999.

HERVE L., ANDRE C. Evaluation d'une technique ELISA pour la détection des anticorps anti-SS-A/Ro. Comparaison avec la technique de référence.

Anticorps anti-SS-A/Ro. Méthodes de dépistage et valeur diagnostique. Hôpital Rotschild - 4 octobre 1996. bmd Edition 1996; 75-82.

HOLLINGSWORTH PN et al. Antinuclear antibodies.

Autoantibodies. Peter JB and Shoenfeld Y, editors. Ed Elsevier 1996, 74-90.

KEECH CL et al. SS-B (La) autoantibodies.

Autoantibodies. Peter JB and Shoenfeld Y, editors. Ed Elsevier 1996, 789-797.

MONIER J.C. et al. Antinuclear antibodies : detection and diagnostic value.

Nucl. Med. Biol. 1990; 17,7, 713-718.

SIBILIA et al. Signification clinique et biologique des anticorps anti-Ro/SS-A. Etude et suivi d'un groupe de 127 patients avec anticorps anti-Ro-SS-A.

Anticorps anti-SS-A/Ro. Méthodes de dépistage et valeur diagnostique. Hôpital Rotschild - 4 octobre 1996. bmd Edition 1996, 91-112.

SONTHEIMER et al. Antinuclear Antibodies: clinical correlations and biological significance.

Adv. Dermatol. 1992; 7, 3-52.

SUMMARY OF METHOD

	AMOUNT TO BE DISTRIBUTED	REAGENTS	INCUBATION CONDITIONS
INCUBATION OF SAMPLES	100µL	Dilution buffer: well A (blank reagent)	30 mn at room temperature
	100µL	Calibrator: well B	
	100µL	Diluted positive samples: wells C to H	
WASHING	Wash 3 times with dilution and washing buffer (300µL/well)		
⚠ Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess liquid.			
INCUBATION OF CONJUGATE	100µL	Anti-h IgG-PEROX Ready to use	30 mn at room temperature
WASHING	Wash 3 times with dilution and washing buffer (300µL/well)		
⚠ Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess liquid.			
ENZYME REACTION	100µL	Substrate solution ABTS	30 mn at room temperature
STOP REACTION	100µL	Stop Solution H ₂ SO ₄ (0.25M)	

SYMBOLS USED



EC Declaration of conformity



ELISA Test



In Vitro Diagnostic Device



Catalogue number



Lot Number



Expiry Date



Number of test



Consult Instructions



Manufactured by



Temperature limitation



Biological risk



Reconstitute with

BioMédical Diagnostics SA

Office
Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tel : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com

