

ENA-DOT 7

REF HM 042



DÉFINITION

Le coffret **ENA-DOT 7** constitue une méthode de détection immunoenzymatique rapide et qualitative d'autoanticorps sur support membranaire. Il permet la recherche simultanée de 7 spécificités :

- ↳ 5 antigènes nucléaires solubles (Extractable Nuclear Antigen) : SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP et Scl-70.
- ↳ et 2 antigènes complémentaires : Jo-1 et centromère.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

La recherche et la caractérisation des anticorps anti-nucléaires (ANA) 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 ANA 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.
- **Anticorps anti-centromère** le plus souvent retrouvés chez des patients présentant une Sclérodémie à localisation restreinte cutanée, désignée par le syndrome CREST.

ECHANTILLONS

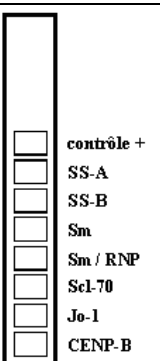
- Le test est à effectuer sur sérum.
- Eviter d'utiliser des sérums lipémiques ou hémolysés, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus d'une fois.
- Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 5 jours maximum, sinon congelés à -20°C.
- Afin de limiter toutes fixations non spécifiques, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

PRINCIPE DU TEST

Les antigènes sont adsorbés sur un support membranaire constitué de 8 puits distincts.

- Dans un premier temps, la membrane est plongée dans un tube réactionnel contenant l'échantillon à tester. S'il contient un ou plusieurs anticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer aux antigènes correspondants. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non fixés.
- Un conjugué, protéine A couplée à la phosphatase alcaline, viendra ensuite se fixer aux autoanticorps précédemment capturés. Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer tout excès de conjugué.
- L'étape de chromogénèse est réalisée en utilisant un substrat insoluble de la phosphatase (BCIP/NBT). Au cours de celle-ci apparaissent des cercles de couleur bleue, traduisant la présence d'autoanticorps dans l'échantillon testé.

COMPOSITION DU COFFRET

		HM042
Bandelettes réactives constituées de 8 puits distincts		25
	<i>Antigènes coatés : protéine purifiée Ro/SS-A (60 kD), protéine purifiée La/SS-B (47 kD), protéine purifiée Sm (mélange de plusieurs polypeptides de poids moléculaires différents), protéine purifiée Sm/RNP (mélange de polypeptides de poids moléculaires différents), protéine purifiée Scl-70 (70kD), protéine purifiée Jo-1 (58 kD) et protéine recombinante CENP-B (80kD).</i>	
Un flacon de Conjugué PAL (protéine A couplée à la phosphatase alcaline) - A diluer	CONJ IgG	650µl
Un flacon de Substrat (BCIP/NBT) Prêt à l'emploi	SUBS BCIP-NBT	35 ml
Un flacon de Tampon Phosphate-Tween (concentré 10x) A reconstituer en eau distillé	BUF WASH 10x	30 ml
Tubes de réaction (1,5ml)		100
Étiquettes autocollantes pour le rendu des résultats		25

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Pipettes de précision
- Chronomètre
- Eau distillée (reconstitution du PBS-Tween concentré)
- Papier absorbant (séchage des bandelettes)
- Portoir de 96 tubes de réaction (bmd, réf. HM501)

STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Les réactifs et les bandelettes 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 bandelettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet déshydratant et les remettre immédiatement entre +2°C et +8°C.
- Remettre immédiatement entre +2°C et +8°C, les réactifs non utilisés.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

S'assurer que les bandelettes soient bien égouttées après chaque lavage.

Si toutes les spécificités sont retrouvées chez un même patient, il est conseillé de contrôler le prélèvement par une autre méthode.

Les réactifs en solutions (excepté le substrat) 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-DOT 7** 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-DOT 7 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.

PRÉPARATION DU DOSAGE

Avant la manipulation, ramener tous les réactifs à température ambiante.

1. Préparation du 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.

2. Préparation des échantillons

- Identifier une bandelette par échantillon.
- Identifier 3 tubes de réaction par échantillon. Les numéroter de 1 à 3 :
 - ≅ tube 1 : incubation de l'échantillon
 - ≅ tube 2 : incubation du conjugué
 - ≅ tube 3 : incubation du substrat
- Distribuer 1,2ml de tampon TDL dans les tubes 1 et 2.
- Préparer un tube supplémentaire réservé aux deux premiers lavages et distribuer 1,2ml de tampon TDL

Remarques :

- ❖ *Le substrat est sensible à la lumière. Il nécessite d'être distribué au moment de son utilisation dans les tubes 3 extemporanément.*
- ❖ *Certaines conditions environnementales comme la température peuvent influencer le résultat final. Pour des températures > +30°C, il est recommandé d'être vigilant sur la cohérence des résultats obtenus.*
- ❖ *Certaines conditions opératoires peuvent influencer l'intensité de la couleur bleue et conduire à une atténuation de celle-ci lorsque :*
 - *le temps d'agitation à chaque lavage est inférieur à 1 minute*
 - *la membrane se colle à la paroi du tube durant les différentes incubations.*
 - *l'homogénéisation, en tampon, de l'échantillon et du conjugué est incomplète.*

INTERPRÉTATION DES RESULTATS

1. Critères de Validation de la Manipulation :

- Le contrôle positif doit présenter un cercle de couleur bleue avec un contour nettement délimité.
- 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.

2. Lecture des bandelettes :

Pour une interprétation aisée et fiable, vérifier que les bandelettes soient totalement sèches.

Pour chaque spécificité, interpréter selon le tableau ci-dessous :

ASPECTS DES PUIITS	RESULTATS
Aucun puits nettement cerclé	Absence d'autoanticorps NEGATIF
Présence d'un cercle distinct et bien délimité dont la coloration est nuancée du clair au sombre	Présence d'autoanticorps POSITIF

Tous puits présentant un cercle peu discernable, sans contour net, doit être contrôlé sur un second prélèvement quelques semaines plus tard et interprétés en fonction d'examen complémentaires et du contexte clinique.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

bmd propose des contrôles multiparamétriques qui peuvent être testés en parallèle (Immunotrol IV, Réf. HM051, pour la recherche du SS-A, SS-B, Sm et Sm-RNP et Immunotrol V, Réf. HM052, pour la recherche du ribosome, centromère, Jo-1, Scl-70 et de l'antigène mitochondrie). Ils sont à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

1. SENSIBILITÉ, SPÉCIFICITÉ, CONCORDANCE PAR RAPPORT À UNE AUTRE MÉTHODE

Le coffret **ENA-DOT 7** a été comparé :

- au coffret ENA-LISA (référence HM008) commercialisé par bmd, et permettant la détermination quantitative par méthode ELISA des anticorps suivants : SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70 et Jo-1,
- au coffret HEp-2000™ (référence IC 2040 RO) commercialisé par bmd, permettant la détermination semi-quantitative de la spécificité complémentaire : centromère, par immunofluorescence indirecte.

L'étude a porté sur 211 échantillons :

⇒ 120 échantillons renfermant au moins l'une des spécificités recherchées,

⇒ 91 échantillons renfermant des facteurs d'interférence potentiels : aspect (turbidité, lyse globulaire, plasma) ou marqueurs biologiques (cryoglobulinémie, hypergammaglobulinémie, Immunoglobulines monoclonales, complexes immuns circulants).

	Sensibilité relative (%) *	Spécificité relative (%) **	Concordance (%) ***
SS-A	97,9 (1/47)	99,4 (1/164)	99,0 (2/211)
SS-B	100 (0/14)	100 (0/197)	100 (0/211)
Sm	90,0 (1/9)	99,5 (1/202)	99,0 (2/211)
Sm/RNP	100 (0/27)	100 (0/184)	100 (0/211)
Scl-70	100 (0/13)	100 (0/198)	100 (0/211)
Jo-1	100 (0/13)	100 (0/198)	100 (0/211)
Centromère	97,3 (1/36)	99,4 (1/175)	99,0 (2/211)

* : échantillons discordants par rapport au nombre total d'échantillons positifs détectés.

** : échantillons discordants par rapport au nombre total d'échantillons négatifs détectés.

*** : échantillons discordants par rapport au nombre total d'échantillons testés.

2. ESTIMATION DE LA VALEUR PRÉDICTIVE DU TEST

Effectuée sur l'ensemble des résultats obtenus, soit sur 1477 tests :

- Valeur prédictive négative : 99,8% (1318/1321)
- Valeur prédictive positive : 98,1% (159/162)

3. MODE DE DÉTERMINATION DU SEUIL DE POSITIVITÉ

Estimé sur les 91 échantillons cités ci-dessus :

- Ces échantillons ont tous été trouvés négatifs par les 3 méthodes ENA-DOT 7, ENA-LISA (seuil : 40 unités arbitraires) ou HEp-2000™ (seuil : 1/80).

4. FIDÉLITÉ DU TEST

Estimée pour 3 spécificités du coffret **ENA-DOT 7**, sur 3 échantillons se situant à différents signaux de positivité : un positif, un faiblement positif ou limite et un négatif.

Spécificité	Titre ENA-LISA Ou HEp-2000™	n	Intra- essai		Inter- essais	
			Aspect des puits ENA-DOT 7	n	Aspect des puits ENA-DOT 7	n
Anti-SS-A	74UA 50UA 4UA	5	Sombre cerclé Clair cerclé Absence de cercle	5	Sombre cerclé Clair cerclé Absence de cercle	5
Anti-Sm/RNP	90UA 47UA 3UA	5	Sombre cerclé Clair cerclé Absence de cercle	5	Sombre cerclé Clair cerclé Absence de cercle	5
Anti-centromère	>1/160 1/40 négatif	5	Sombre cerclé Clair cerclé Absence de cercle	5	Sombre cerclé Clair cerclé Absence de cercle	5

Comparaison des performances du coffret ENA-DOT 7 nouvelle version (protocole court) avec celles de l'ancien coffret ENA-DOT 7 (protocole long)

L'étude a porté sur 183 échantillons :

⇒ 91 échantillons renfermant au moins l'une des spécificités recherchées,

⇒ 34 échantillons renfermant des facteurs d'interférence potentiels : aspect (turbidité, lyse globulaire, plasma) ou marqueurs biologiques (cryoglobulinémie, hypergammaglobulinémie, Immunoglobulines monoclonales, complexes immuns circulants),

⇒ 58 échantillons provenant d'individus sains.

	Sensibilité relative (%) *	Spécificité relative (%) **	Concordance (%) ***
SS-A	100 (0/30)	100 (0/153)	100 (0/183)
SS-B	100 (0/4)	100 (0/179)	100 (0/183)
Sm	100 (0/9)	99,4 (1/174)	99,5 (1/183)
Sm/RNP	100 (0/31)	100 (0/152)	100 (0/183)
Scl-70	100 (0/7)	99,4 (1/176)	99,5 (1/183)
Jo-1	100 (0/10)	100 (0/173)	100 (0/183)
Centromère	100 (0/18)	100 (0/165)	100 (0/183)

* : échantillons discordants par rapport au nombre total d'échantillons positifs détectés.

** : échantillons discordants par rapport au nombre total d'échantillons négatifs détectés.

*** : échantillons discordants par rapport au nombre total d'échantillons testés.

LISTE DES SYMBOLES

	Référence produit
	Numéro de lot
	Nombre de tests
	Test unitaire
	Pour le diagnostic <i>in vitro</i> uniquement
	Date d'expiration
	A conserver entre +2-+30°C
	Lire les instructions d'utilisation
	Conforme à la réglementation CE
	A reconstituer ou diluer avec de l'eau
	Contient de l'azide de sodium
	Contient du Proclin

BIBLIOGRAPHIE

CONRAD K. et al. Autoantibodies – Diagnostic, pathogenic and prognostic relevance.

Clin. And Exp. Rheumatol. 1997 ; 15, 457-465

ERMENS A. et al. Simple Dot-Blot method evaluated for detection of autoantibodies against extractable antigens. *Clin. Chemistry* 1997 ; 43, 12, 2420-2422.

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 P.N. et al. Antinuclear antibodies

In : Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. *Elsevier Science, 1996, Amsterdam. 74-90.*

HOMBURGER H.A. Cascade testing for autoantibodies in connective tissue disease. *Mayo Clin. Proc.*, 1995, 70, 183-184.

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

MEWIS A. et al.

Evaluation of a DOT-Blot method for identification of antibodies against extractable nuclear antigens and anti-cytoplasmic antibodies. *Clin Chem., 1999, 45 (2), 311-312.*

ROUSSEL B. et al.

Analyse d'une technique dot-blot pour la détection de trois autoanticorps (anti-JO-1, anti-M2 et anti-ribosomes).

Comparaison avec les techniques de références. *Ann. Biol. Clin., 1995, 53, 487-490.*

SPENCER GREEN G. et al.

Test performance in systemic sclerosis : anti-centromère and anti-Scl70 antibodies. *Am. J. of Med., 1997, 18, 291-300.*

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

	OPERATIONS A EFFECTUER	TEMPS D'INCUBATION
INCUBATION DES SERUMS	<ul style="list-style-type: none"> - Ajouter 20 µl d'échantillon dans le tube 1 contenant le tampon TDL. - Y plonger la bandelette identifiée - Déclencher le chronomètre. - Agiter* manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15s) - Laisser ensuite incuber <u>sans agiter</u>. 	10 minutes à T.A
Pendant l'incubation des échantillons, distribuer 20µl de conjugué dans le tube 2 contenant le TDL		
LAVAGE	<ul style="list-style-type: none"> - Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL. - Agiter* manuellement. - Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant. 	1 minute à T.A
INCUBATION DU CONJUGUE	<ul style="list-style-type: none"> - Plonger la bandelette dans le tube 2. - Déclencher le chronomètre. - Agiter* manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15s) - Laisser ensuite incuber <u>sans agiter</u>. 	10 minutes à T.A
En fin d'incubation du conjugué, distribuer 1,2ml de substrat dans le tube 3		
LAVAGE	<ul style="list-style-type: none"> - Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL. - Agiter* manuellement. - Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant. 	1 minute à T.A
INCUBATION DU SUBSTRAT	<ul style="list-style-type: none"> - Placer la bandelette dans le tube 3. - Déclencher le chronomètre. - Agiter* manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15s) - Laisser ensuite incuber <u>sans agiter</u>. 	5 minutes à T.A
LAVAGE	<ul style="list-style-type: none"> - Laver la bandelette sous l'eau du robinet. 	
SECHAGE	<ul style="list-style-type: none"> - Eliminer l'eau résiduelle en déposant la bandelette sur un papier absorbant et laisser sécher complètement avant l'interprétation du résultat. 	environ 30 minutes à T.A

T.A : Température Ambiante entre +18°C et + 25°C. * : Les agitations doivent être lentes et verticales.

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-DOT 7

REF **HM 042**



DEFINITION

The **ENA-DOT 7** kit is a qualitative enzyme immunoassay (EIA) for the simultaneous detection of 7 antibody specificities:

- ↪ against Extractable Nuclear Antigens : SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP and Scl-70,
- ↪ and against 2 additional antigens : centromere 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.

Many elaborate serological studies have demonstrated significant associations between these autoantibodies and the various connective 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.
- **Anti-Centromere antibodies** are most often found in sera from patients having Scleroderma with limited skin involvement **CREST**, called **CREST syndrome**.

SAMPLES COLLECTION AND HANDLING

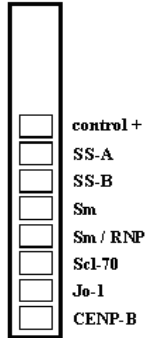
- The test is performed on serum.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- If the test is not run immediately, the samples should be stored at +2°C/+8°C for a maximum of 5 days, for longer storage, frozen undiluted samples at -20°C.
- To avoid non-specific bindings, it is recommended to centrifuge and filter the cloudy samples or samples frozen for more than 6 months.

ASSAY PRINCIPLE

The antigens are coated on distinct membranes on the assay strip.

- First, the assay strip is incubated in a reaction tube containing the diluted sample of the patient. If this sample contains at least one of the antibodies, these antibodies will recognize and bind to the corresponding antigen. After incubation, a first wash step removes all of the unbound proteins.
- An alkaline phosphatase labelled protein A conjugate binds to the captured antibodies. The excess of unbound conjugate is removed by a second wash step.
- The bound conjugate is visualized with an insoluble substrate for the phosphatase enzyme (BCIP/NBT). This will give rise to a blue colored circle, confirming the presence of autoantibodies in the sample tested.

REAGENTS

		HM042
Assay strips	 <p>Coated antigens: purified Ro/SS-A protein (60kD), purified La/SS-B protein (47kD), purified Sm protein (mix of several polypeptides of differing molecular weights), purified Sm/RNP protein (mix of several polypeptides of differing molecular weights), purified Scl-70 protein (70kD), purified Jo-1 protein (58kD) and recombinant CENP-B (80kD).</p> <p>STRIP</p>	25
1 vial of PAL conjugate (alkaline phosphatase labelled protein A) To be diluted	CONJ IgG	650 µL
1 vial of Substrate (BCIP/NBT) Ready to use	SUBS BCIP-NBT	35 mL
1 vial of Phosphate-Tween buffer (concentrate 10x) To be diluted in distilled water	BUF WASH 10x	30 mL
Reaction tubes (1,5mL)		100
Self-stick labels for returned results		25

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Pipettes
- Timer
- Distilled water (to dilute the concentrated Phosphate-Tween buffer)
- Adsorbent towels (to blot dry the assay strip)
- Support for 96 reaction tubes (bmd, cat. HM501)

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.

PRECAUTIONS

Be sure that the strips are dry after each wash.

If all specificities are found with the same patient, it is advisable to control this sample with another method.

Reagents in solution (except for substrate buffer) contain less of 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 in copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.

ENA-DOT 7 has been developed according CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labelling of dangerous preparations.

ENA-DOT 7 has been optimized for the use as describe 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.

SETUP

All reagents must be at room temperature before use.

1. Preparation of the wash and dilution buffer

- Dilute 10 times the concentrated Phosphate-Tween buffer in distilled water.
- Storage period: 3 months at +2°C/+8°C

2. Preparation of samples

- Mark one strip per sample.
- Mark 3 reaction tubes per sample and number from 1 to 3:
 - ≈ tube 1: sample incubation.
 - ≈ tube 2: conjugate incubation.
 - ≈ tube 3: substrate incubation.
- Dispense 1.2mL of wash and dilution buffer in tubes 1 and 2.
- Mark another microtube reserved for the two first washing steps and dispenses 1.2mL of wash and dilution buffer.

Remarks and precautions:

- ❖ The substrate is light sensitive. It requires to be dispense immediately at the time of his use in the tubes 3.
- ❖ Certain environmental conditions as the temperature may influence the final result. For temperatures > +30°C, it is recommended to be vigilant on the coherence of the results obtained.
- ❖ Certain operational conditions may influence the intensity of the blue color and should therefore be avoided:
 - the agitation time in each wash step is less than a minute
 - the membrane sticking to the wall of the vessel during incubation steps.
 - incomplete mixing of sample and conjugate

INTERPRETATION OF RESULTS

1. Validation criterion for the manipulation:

- The positive control should give a blue colored circle with a well defined outline.
- 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 another method.

2. Reading of the strips:

In order to interpret correctly make sure that the strips are completely dry.

For each specificity, interpret according to this scheme:

APPEARANCE OF THE WELL	RESULTS
no circle	absence of auto-antibodies NEGATIVE
presence of a circle of which the staining is variable from bright to dark	presence of auto-antibodies POSITIVE

Each membrane showing a difficult to distinguish circle should be controlled with a second blood sample, drawn a few weeks later. The interpretation of the results should be done in relation to other examinations and in the clinical context.

QUALITY CONTROL

bmd offers a multiparametric quality controls (Immunotrol IV, Cat. No HM051, for determination of SS-A, SS-B, Sm and Sm-RNP and Immunotrol V, Cat. No HM052, for determination of ribosome, centromere, Jo-1, Scl-70 and mitochondrial antigen). They contains antibodies directed against one of the 7 specificities; and must be handled in the same way as samples.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCE OF THE TEST

1. INDICATION OF THE DIAGNOSTIC VALUE IN COMPARISON WITH AN OTHER METHOD

ENA-DOT 7 has been compared:

- with ENA-LISA (cat. N° HM008) commercialized by bmd for quantitative determination by ELISA method of: SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70 and Jo-1 specificities.
- with HEp-2000™ (cat. N° IC 2040 RO), commercialized by bmd for centromere, nuclear antigen specificity by indirect immunofluorescence.

The study was performed on 211 samples:

- ⇒ 120 samples with at least one of the evaluated specificities
- ⇒ 91 samples with potential interferences factors: aspect (turbidity, globular, plasma) or biological markers (cryoglobulinemia, hypergammaglobulinemia, monoclonal immunoglobulins, circulating immune complexes)

	Relative sensitivity (%) *	Relative specificity (%) **	Concordance (%) ***
SS-A	97,9 (1/47)	99,4 (1/164)	99,0 (2/211)
SS-B	100 (0/14)	100 (0/197)	100 (0/211)
Sm	90,0 (1/9)	99,5 (1/202)	99,0 (2/211)
Sm/RNP	100 (0/27)	100 (0/184)	100 (0/211)
Scl-70	100 (0/13)	100 (0/198)	100 (0/211)
Jo-1	100 (0/13)	100 (0/198)	100 (0/211)
Centromere	97,3 (1/36)	99,4 (1/175)	99,0 (2/211)

*: discordant samples / total number of positive samples detected

** : discordant samples / total number of negative samples detected

***: discordant samples / total number of samples tested

2. ESTIMATION OF PREDICTIVE VALUE

Calculated on 1477 tests:

- Negative predictive value : 99,8% (1318/1321)
- Positive predictive value : 98,1% (159/162)

3. VERIFICATION OF POSITIVE THRESHOLD

Calculated on the 91 samples described above:

- These samples have been found by the three methods: ENA-DOT 7, ENA-LISA (threshold: 40 arbitrary units) or HEp-2000™ (threshold: 1/80).

4. REPRODUCIBILITY

Calculated for 3 specificities of ENA-DOT 7 kit, with different signals of positivity: positive, weakly positive or borderline and negative.

Specificity	Titre ENA-LISA Or HEp-2000™	intra-assay		between-assays	
		n	ENA-DOT 7 Appearance	n	ENA-DOT 7 Appearance
Anti-SS-A	74UA	5	dark circle	5	dark circle
	50UA		bright circle		bright circle
	4UA		no circle		no circle
Anti-Sm/RNP	90UA	5	dark circle	5	dark circle
	47UA		bright circle		bright circle
	3UA		no circle		no circle
Anti-centromere	>1/160	5	dark circle	5	dark circle
	1/40		bright circle		bright circle
	negative		no circle		no circle

Performance comparison of ENA-DOT 7, new version (short procedure) to ENA-DOT 7, old version (long procedure)

The study was performed on 183 samples:

- ⇒ 91 samples with at least one of the evaluated specificities,
- ⇒ 34 samples with potential interferences factors: aspect (turbidity, globular, plasma) or biological markers (cryoglobulinemia, hypergammaglobulinemia, monoclonal immunoglobulins, circulating immune complexes),
- ⇒ 58 samples of blood donors.










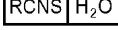

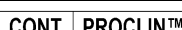
	Relative sensitivity (%) *	Relative specificity (%) **	Concordance (%) ***
SS-A	100 (0/30)	100 (0/153)	100 (0/183)
SS-B	100 (0/4)	100 (0/179)	100 (0/183)
Sm	100 (0/9)	99,4 (1/174)	99,5 (1/183)
Sm/RNP	100 (0/31)	100 (0/152)	100 (0/183)
Scl-70	100 (0/7)	99,4 (1/176)	99,5 (1/183)
Jo-1	100 (0/10)	100 (0/173)	100 (0/183)
Centromere	100 (0/18)	100 (0/165)	100 (0/183)

*: discordant samples / total number of positive samples detected

** : discordant samples / total number of negative samples detected

***: discordant samples / total number of samples tested

SYMBOLS USED

	Catalog number
	Batch code
	Number of tests
	Rapid test
	In vitro diagnostic device
	Use by
	Storage temperature limitation
	Read instructions for use
	EC Declaration of Conformity
	Reconstitute with water
	Contains sodium azide
	Contains Proclin

BIBLIOGRAPHY

CONRAD K. et al. Autoantibodies – Diagnostic, pathogenic and prognostic relevance. *Clin. and Exp. Rheumatol.* 1997 ;15, 457-465

ERMENS A. et al. Simple Dot-Blot method evaluated for detection of autoantibodies against extractable antigens. *Clin. Chemistry* 1997 ; 43, 12, 2420-2422.

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 P.N. et al. Antinuclear antibodies
In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. *Elsevier Science, 1996, Amsterdam. 74-90.*

HOMBURGER H.A. Cascade testing for autoantibodies in connective tissue disease. *Mayo Clin. Proc., 1995, 70, 183-184.*

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

MEWIS A. et al.
Evaluation of a DOT-Blot method for identification of antibodies against extractable nuclear antigens and anti-cytoplasmic antibodies. *Clin Chem., 1999, 45 (2), 311-312.*

ROUSSEL B. et al.
Analyse d'une technique dot-blot pour la détection de trois autoanticorps (anti-JO-1, anti-M2 et anti-ribosomes). Comparaison avec les techniques de références. *Ann. Biol. Clin., 1995, 53, 487-490.*

SPENCER GREEN G. et al.
Test performance in systemic sclerosis: anti-centromère and anti-Scl70 antibodies. *Am. J. of Med., 1997, 18, 291-300.*

SUMMARY OF METHOD

	OPERATIONS STEPS	INCUBATION TIME
INCUBATION OF SAMPLES	<ul style="list-style-type: none"> - Add 20µL sample to tube 1 containing wash and dilution buffer. - Put in the identified strip. - Start the alarm. - Move* the strip manually 20 times up and down (during 15s) - Then incubate <u>without shaking</u>. 	10 minutes at R.T
During sample incubation, add 20µL conjugate to tube 2 containing wash and dilution buffer		
WASH	<ul style="list-style-type: none"> - Put the strip in the corresponding wash tube with wash and dilution buffer. - Move* manually. - Take the strip out of the tube and remove residual buffer by blotting the strip with an adsorbent towel. 	1 minute at R.T
INCUBATION WITH CONJUGATE	<ul style="list-style-type: none"> - Put the strip in tube 2. - Start the alarm. - Move* the strip manually 20 times up and down (during 15s) - Then incubate <u>without shaking</u>. 	10 minutes at R.T
At the end of the conjugate incubation, dispense 1.2mL of substrate in tube 3		
WASH	<ul style="list-style-type: none"> - Put the strip in the corresponding wash tube with wash and dilution buffer. - Move* manually. - Take the strip out of the tube and remove residual buffer by blotting the strip with an adsorbent towel. 	1 minute at R.T
INCUBATION OF SUBSTRATE	<ul style="list-style-type: none"> - Put the strip in tube 3. - Start the alarm. - Move* the strip manually 20 times up and down (during 15s) - Then incubate <u>without shaking</u>. 	5 minutes at R.T
WASH	<ul style="list-style-type: none"> - Wash the strip under tap water. 	
DRY	<ul style="list-style-type: none"> - Remove water by blotting the strip with an adsorbent towel and let dry completely before reading the result. 	about 30 minutes at R.T

R.T : Room Temperature between +18°C and + 25°C. * : Up and down agitations should be slow.

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

