

# CYTO-DOT

**REF** HM 043

**Français**

## DÉFINITION

Le coffret **CYTO-DOT 4** constitue une méthode de détection immunoenzymatique rapide et qualitative d'autoanticorps sur support membranaire. Il permet la recherche simultanée de 4 spécificités à localisation cytoplasmique : ribosomes, mitochondries de type 2, Jo-1 et LKM-1.

## VALEUR DIAGNOSTIQUE

- Anticorps anti-mitochondries de type M2**  
 Parmi les 9 types d'anticorps dirigés contre différents composants des mitochondries (M1 à M9), l'anticorps de type M2 est le plus fréquent. Il constitue un marqueur sensible et spécifique de la cirrhose biliaire primitive (présent dans 90% des cas).  
 On le trouve beaucoup plus rarement dans certaines hépatopathies chroniques.
- Anticorps anti-ribosomes**  
 Ces anticorps ont été signalés associés aux anticorps anti-nucléaires dans 10 à 20% des lupus.  
 Leur intérêt réside dans leur forte association aux localisations neurologiques centrales du lupus.
- Anticorps anti-Jo-1**  
 Il reconnaît l'histidyl ARNt synthétase, enzyme permettant de fixer l'histidine sur l'ARN de transfert (50Kd).  
 Il est présent, avec une fréquence variable, dans le sérum de patients atteints de polymyosite, dermatopolymyosite ou de syndrome de chevauchement.  
 Il caractériserait surtout les formes avec fibrose pulmonaire interstielle diffuse.
- Anticorps anti-LKM-1**  
 Les anticorps anti-LKM-1 réagissent avec le cytochrome P450 2D6. Ils caractérisent l'hépatite auto-immune de type II, pour laquelle ils reconnaissent un épitope majeur de 9 acides aminés (262-270) sous forme linéaire. D'autres facteurs étiologiques peuvent induire la production d'anticorps anti-LKM-1 : médicament (halothane), virus (virus de l'hépatite C) et affection auto-immune primitive multifactorielle.

## MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

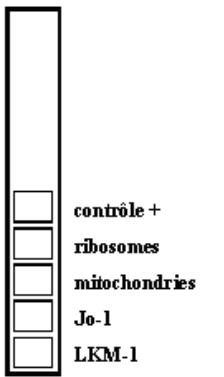
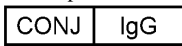


- Pipettes de précision
- Chronomètre
- Eau distillée (reconstitution du PBS-Tween concentré)
- Papier absorbant (séchage des bandelettes)
- Portoir de 96 tubes de réaction (bmd, réf. HM501)

## PRINCIPE DU TEST

Les antigènes sont adsorbés sur un support membranaire constitué de 5 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

		HM043
Bandelettes réactives constituées de 5 puits distincts correspondant aux spécificités suivantes :		10
	Antigènes coâtés : protéines ribosomales (mélange de plusieurs phosphoprotéines purifiées de poids moléculaires différents), protéines mitochondriales de type M2 (mélange de plusieurs protéines purifiées de poids moléculaires différents), protéine purifiée Jo-1 (58kD) et protéine recombinante LKM-1 (60 kD).	
Un flacon de Conjugué PAL (protéine A couplée à la phosphatase alcaline) A diluer		300µl
Un flacon de Substrat (BCIP/NBT) Prêt à l'emploi		12 ml
Un flacon de Tampon Phosphate-Tween (concentré 10x) A reconstituer en eau distillé		30 ml
Tubes de réaction (1,5ml)		40
Étiquettes autocollantes pour le rendu des résultats		10

## 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.

## 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 **CYTO-DOT 4** 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.

**CYTO-DOT 4** 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.

## 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.

## 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 1ml de tampon TDL dans les tubes 1 et 2.
- Préparer un tube supplémentaire réservé aux deux premiers lavages et distribuer 1ml 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 plusieurs spécificités sont retrouvées chez un même patient, 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 un contrôle multiparamétrique (Immuno-Trol V, réf.: HM052) qui peut être testé en parallèle. Il renferme des anticorps humains dirigés contre l'une des 4 spécificités recherchées. Il est 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 **CYTO-DOT 4** a été comparé :

- Au coffret TRIPLE SUBSTRAT DE RAT (référence ME1248) commercialisé par bmd, permettant le dépistage et le titrage des autoanticorps anti-ribosomes, anti-mitochondrie de type M2 et anti-LKM-1 par immunofluorescence indirecte sur coupes de foie, rein et estomac.
- Au coffret ENA-LISA (référence HM008) commercialisé par bmd, permettant la détermination semi-quantitative par une technique ELISA des autoanticorps anti-ENA et en particulier les autoanticorps dirigés contre la spécificité Jo-1.

L'étude a porté sur 187 échantillons :

- ⇒ 91 échantillons susceptibles de renfermer au moins une des spécificités recherchées,
- ⇒ 49 échantillons provenant d'individus sains,
- ⇒ 47 échantillons renfermant des facteurs d'interférence potentiels (aspect et nature du prélèvement, autres marqueurs biologiques susceptibles de provoquer des réactions faussement positives).

	Sensibilité relative		Spécificité relative		Concordance	
	(%)	*	(%)	**	(%)	***
<b>Ribosome</b>	100	(0/10)	100	(0/177)	100	(0/187)
<b>M2</b>	96.8	(2/61)	100	(0/124)	98.9	(2/187)
<b>Jo-1</b>	100	(0/11)	100	(0/176)	100	(0/187)
<b>LKM-1</b>	100	(0/9)	100	(0/178)	100	(0/187)

\* : 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 PRÉDICTIONNELLE DU TEST

Elle a été calculée sur l'ensemble des résultats obtenus, soit sur 748 tests :

- Valeur prédictive négative : 99.7% (655/657)
- Valeur prédictive positive : 100% (93/93)

## 3. VÉRIFICATION DU SEUIL DE POSITIVITÉ

Le seuil de positivité a été estimé sur 145 échantillons :

- ⇒ 49 échantillons provenant d'individus sains
- ⇒ 47 échantillons ne renfermant pas d'anticorps anti-ENA mais susceptible de provoquer des interférences biologiques en raison de leur aspect (turbidité, lyse globulaire, plasma), de la présence de marqueurs biologiques liés à d'autres pathologies (cryoglobulinémie, hypergammaglobulinémie IgG, IgM monoclonales, complexes immuns circulants, complément, facteurs rhumatoïdes, autres maladies autoimmunes).

L'ensemble de ces échantillons ont été trouvés négatifs.

## 4. FIDÉLITÉ DU TEST

Elle a été estimée pour 2 spécificités du coffret **CYTO-DOT 4**, sur 3 échantillons se situant à différents degrés de réactivité : un positif, un faiblement positif ou limite et un négatif.

Spécificité	Titre Triple substrat	INTRA-ESSAI		INTER-ESSAIS	
		n	Aspect des puits CYTO-DOT 4	n	Aspect des puits CYTO-DOT 4
<b>Anti-ribosomes</b>	>1/320 1/40 négatif	5	Sombre cerclé Clair cerclé Absence de cercle	5	Sombre cerclé Clair cerclé Absence de cercle
<b>Anti-LKM-1</b>	>1/160 1/40 négatif	5	Sombre cerclé Clair cerclé Absence de cercle	5	Sombre cerclé Clair cerclé Absence de cercle

La technique ne permettant pas d'exprimer les résultats de façon quantitative, il n'est pas possible d'estimer la fidélité du test sous la forme d'un coefficient de variation.

L'ensemble des tests intra-essai et inter-essais a été comparé et a donné un aspect identique, ce qui témoigne d'une excellente fidélité globale.

## 5. COMPARAISON DES PERFORMANCES DU COFFRET CYTO-DOT 4, NOUVELLE VERSION (PROTOCOLE COURT) A CELLES DE L'ANCIEN COFFRET CYTO-DOT 4 (PROTOCOLE LONG)

L'étude a porté sur 193 échantillons :

- ⇒ 69 échantillons susceptibles de renfermer au moins une des spécificités recherchées,
- ⇒ 62 échantillons provenant d'individus sains,
- ⇒ 62 échantillons renfermant des facteurs d'interférence potentiels (aspect et nature du prélèvement, autres marqueurs biologiques susceptibles de provoquer des réactions faussement positives).










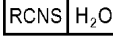


	Sensibilité relative		Spécificité relative		Concordance	
	(%)	*	(%)	**	(%)	***
<b>Ribosome</b>	100	(0/9)	100	(0/184)	100	(0/193)
<b>M2</b>	100	(0/42)	99.3	(1/151)	99.5	(1/193)
<b>Jo-1</b>	100	(0/10)	100	(0/59)	100	(0/193)
<b>LKM-1</b>	100	(0/8)	99.5	(1/185)	99.5	(1/193)

\* : 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

- ABUAF N. et al.  
Non-organ-specific autoantibodies associated with chronic C virus hepatitis. *J. Hepatol.*, 1993, 18, 359-364.
- ARNET F.C. et al.  
Ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 1996, 39, 1833-183.
- BASSENDINE M.F.  
Antimitochondrial and other autoantibodies in primary biliary cirrhosis. In: Krawitt EL, Wiesner RH and Nishioka M. *Autoimmune liver disease*, second edition. Elsevier Science B.V., 1998, Amsterdam. 287-304, 1998
- ERMENS A. et al.  
Simple dot-Blot method evaluated for detection of antibodies against extractable nuclear antigens. *Clin Chem.*; 43 (12), 1997, 2420-2422.

HOMBERG J.C. et al.  
Antibodies to endoplasmic reticulum and cytosol in auto-immune hepatitis. In: Krawitt EL, Wiesner RH and Nishioka M. Autoimmune liver disease, second edition. Elsevier Science B.V., Amsterdam. 1998, 257-271.

LEUNG P.S.C. et al.  
Mitochondrial autoantibodies. In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, 1996, Amsterdam. 494-500.

MADDISON P.D.  
Aminoacyl-tRNA histidyl (Jo-1) synthetase autoantibodies. In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, 1996, Amsterdam. 31-35.

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.

YOSHIO T. et al.  
A close temporal relationship of liver disease to antiribosomal P0 protein antibodies and central nervous system disease in patients with systemic lupus erythematosus. J. Rheumatol., 1998, 25, 681-688.

## SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

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

# CYTO-DOT

**REF** HM 043



## DEFINITION

The **CYTO-DOT 4** kit is a qualitative enzyme immunoassay (EIA) for the simultaneous detection of 4 cytoplasmic specificities: ribosome, mitochondria (M2), Jo-1 and LKM-1.

## DIAGNOSTIC VALUE

- Mitochondrial antibodies type M2**  
 Among the 9 types of antibodies directed against different components of mitochondria (M1 to M9), the antibody of type M2 is the most frequent. It is a sensitive and specific marker for primary biliary cirrhosis (present in 90% of the cases). It is found rarely in certain chronic hepatic diseases.
- Anti-ribosomal antibodies**  
 These antibodies are found in association with anti-nuclear antibodies in 10 to 20% of lupus. *Their interest lays in their strong association with central neurological abnormalities in lupus.*
- Anti-Jo-1 antibodies**  
 These antibodies recognize the histidyl-tRNA synthetase, an enzyme responsible for complexing the amino acid histidine to its cognate transfer RNA (50kD). It is present, with a variable frequency, in serum of patients with polymyositis, dermatomyositis or overlap syndromes. These antibodies are characteristic particularly in the forms with diffuse interstitial lung fibrosis.
- Anti-LKM-1 antibodies**  
 Anti-LKM-1 antibodies react with cytochrome P450 II D6. They are markers of autoimmune hepatitis type II, for which they recognize a major epitope of 9 amino acids (262-270) on linear form. Other etiologic factors can induce the production of anti-LKM-1 antibodies: drug (halothane), virus (hepatitis C), and multifactorial autoimmune primitive disorder.

## MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

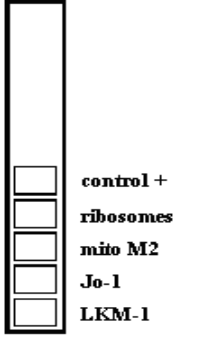
- Pipettes
- Timer
- Distilled water (to dilute the concentrated Phosphate-Tween buffer)
- Adsorbent towels (to blot dry the assay strip)
- Support for 96 reaction tubes (bmd, cat. HM501)

## 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 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 labeled protein A conjugate binds to the captured antibodies. The excess of unbound conjugate is removed by a second wash step.
- The bound conjugate is visualised with an insoluble substrate for the phosphatase enzyme (BCIP/NBT). This will give rise to a blue colored circle, confirming the presence of auto-antibodies in the sample tested.

## REAGENTS

		HM043
Assay strips		10
	Antigens coated: ribosomal proteins (mix of several purified phosphoproteins of different molecular weights), mitochondrial M2 proteins (mix of several purified proteins of differing molecular weights), purified Jo1 protein (58kD) and recombinant LKM-1 protein (60kD). <b>STRIP</b>	
1 vial of PAL Conjugate (Phosphatase alkaline labeled protein A) To be diluted	CONJ   IgG	300µL
1 vial of Substrate (BCIP/NBT) Ready to use	SUBS   BCIP-NBT	12mL
1 vial of Phosphate-Tween buffer (concentrate 10x) To be diluted in distilled water	BUF   WASH   10x	30mL
Reaction tubes (1,5mL)		40
Self-stick labels for returned results		10

## 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 binding, it is recommended to centrifuge and filter the cloudy samples or samples frozen for more than 6 months.

## 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 an other 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.

**CYTO-DOT 4** has been developed according CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labelling of dangerous preparations.

**CYTO-DOT 4** 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.

## 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 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 1mL of wash and dilution buffer in tubes 1 and 2.
- Mark another microtube reserved for the two first washing steps and dispenses 1mL 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 step.
  - 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 all specificities are found with the same patient, it is recommended to control this sample with an other method.

### 2. Reading of the strips:

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

For each specificity interpret 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 control (Immunotrol V, Cat. No: HM052) which contains antibodies directed against one of the 4 specificities; it 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

**CYTO-DOT 4** has been compared :

- With RAT TRIPLE SUBSTRATE (Cat. ME1248) commercialized by bmd for screening and titering of anti-ribosomal, anti-mitochondrial subtype M2 and anti-LKM-1 autoantibodies by indirect immunofluorescence on rat kidney, stomach and liver substrate.
- With ENA-LISA (Cat. HM008) commercialized by bmd for semi-quantitative determination by ELISA method of anti-ENA antibodies and especially for Jo-1 specificity.

Study was performed on 187 samples :

- ⇒ 91 samples with at least one of the evaluated specificities,
- ⇒ 49 samples of blood donor,
- ⇒ 47 samples with potential interference factors : aspect (turbidity, globular lysis, plasma) or biological markers (cryoglobulinemia, hypergammaglobulinemia, monoclonal immunoglobulins, circulating immune complexes).

	Relative sensibility		Relative specificity		Concordance	
	(%)	*	(%)	**	(%)	***
<b>Ribosome</b>	100	(0/10)	100	(0/177)	100	(0/187)
<b>M2</b>	96.8	(2/61)	100	(0/124)	98.9	(2/187)
<b>Jo-1</b>	100	(0/11)	100	(0/176)	100	(0/187)
<b>LKM-1</b>	100	(0/9)	100	(0/178)	100	(0/187)

- \* : 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 748 tests :

- Negative predictive value : 99.7% (655/657)
- Positive predictive value : 100% (93/93)

## 3. VERIFICATION OF POSITIVE THRESHOLD

Calculated on the 145 samples :

- ⇒ 49 samples of blood donors,
- ⇒ 47 samples with potential interference factors : aspect (turbidity, globular lysis, plasma) or biological markers (cryoglobulinemia, hypergammaglobulinemia, monoclonal immunoglobulins, circulating immune complexes).

These samples have been found negative.

## 4. REPRODUCIBILITY

Calculated for 2 specificities of **CYTO-DOT 4** kit, with different positivity degrees : positive, weakly positive or borderline and negative.

Specificity	Triple substrate Titer	INTRA-ASSAY		INTER-ASSAYS	
		n	CYTO-DOT 4 appearance	n	CYTO-DOT 4 appearance
<b>Anti-ribosomes</b>	>1/320 1/40 négatif	5	Dark circle Bright circle No circle	5	Dark circle Bright circle No circle
<b>Anti-LKM-1</b>	>1/160 1/40 négatif	5	Dark circle Bright circle No circle	5	Dark circle Bright circle No circle

Precision of the test couldn't be evaluated by a coefficient of variation, because **CYTO-DOT 4** is not a quantitative method.

But all tests have been compared together; they have the same appearance. The reproducibility is excellent.

## 5. PERFORMANCE COMPARISON OF CYTO-DOT 4, NEW VERSION (SHORT PROCEDURE) TO CYTO-DOT 4, PREVIOUS VERSION (LONG PROCEDURE)










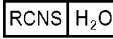

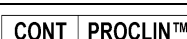
Study was performed on 193 samples :

- ⇒ 69 samples with at least one of the evaluated specificities,
- ⇒ 62 samples of blood donor,
- ⇒ 62 samples with potential interference factors : aspect (turbidity, globular lysis, plasma) or biological markers (cryoglobulinemia, hypergammaglobulinemia, monoclonal immunoglobulins, circulating immune complexes).

	Relative sensibility		Relative specificity		Concordance	
	(%)	*	(%)	**	(%)	***
<b>Ribosome</b>	100	(0/9)	100	(0/184)	100	(0/193)
<b>M2</b>	100	(0/42)	99.3	(1/151)	99.5	(1/193)
<b>Jo-1</b>	100	(0/10)	100	(0/59)	100	(0/193)
<b>LKM-1</b>	100	(0/8)	99.5	(1/185)	99.5	(1/193)

- \* : 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

- ABUAF N. et al.  
Non-organ-specific autoantibodies associated with chronic C virus hepatitis. J. Hepatol., 1993, 18, 359-364.
- ARNET F.C. et al.  
Ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum., 1996, 39, 1833-183.
- BASSENDINE M.F.  
Antimitochondrial and other autoantibodies in primary biliary cirrhosis. In: Krawitt EL, Wiesner RH and Nishioka M. Autoimmune liver disease, second edition. Elsevier Science B.V., 1998, Amsterdam. 287-304, 1998
- ERMENS A. et al.  
Simple dot-Blot method evaluated for detection of antibodies against extractable nuclear antigens. Clin Chem.; 43 (12), 1997, 2420-2422.

HOMBERG J.C. et al.  
Antibodies to endoplasmic reticulum and cytosol in auto-immune hepatitis. In: Krawitt EL, Wiesner RH and Nishioka M. Autoimmune liver disease, second edition. Elsevier Science B.V., Amsterdam. 1998, 257-271.

LEUNG P.S.C. et al.  
Mitochondrial autoantibodies. In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, 1996, Amsterdam. 494-500.

MADDISON P.D.  
Aminoacyl-tRNA histidyl (Jo-1) synthetase autoantibodies. In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, 1996, Amsterdam. 31-35.

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.

YOSHIO T. et al.  
A close temporal relationship of liver disease to antiribosomal P0 protein antibodies and central nervous system disease in patients with systemic lupus erythematosus. J. Rheumatol., 1998, 25, 681-688.

## SUMMARY OF METHOD

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

