

ELISIS ENA Profile



LIS 1101



Français

DÉFINITION

Le coffret **ELISIS ENA Profile** ([bmd](#)) permet une recherche qualitative, par méthode ELISA, de 8 spécificités antigéniques dans le sérum humain. Les puits sont individuellement sensibilisés par les antigènes suivants: U1-snRNP, SS-B, SS-A (52 kDa et 60 kDa), Scl-70, CENP-B, Jo-1, snRNP/Sm et Sm.

Les résultats obtenus avec le coffret **ELISIS ENA Profile** ([bmd](#)) associés à des examens complémentaires et au contexte clinique, constituent pour le clinicien un élément important du diagnostic des Connectivites (Lupus Erythémateux Disséminé (LED), Syndrome de Sjögren, Connectivite mixte (MCTD), Sclérodermie, Dermatomyosite et Syndrome de CREST).

Le coffret **ELISIS ENA Profile** ([bmd](#)) peut être utilisé avec l'automate de dilution/répartition **CARIS™**.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les Connectivites sont des maladies auto-immunes systémiques dont chacune d'elle est dirigée principalement contre un organe particulier et dont le classement repose sur des critères cliniques et biologiques. Leur diagnostic différentiel est ainsi grandement facilité par la mise en évidence des anticorps anti-nucléaires qui apparaissent souvent de façon précoce au cours de la maladie alors que la symptomatologie est encore incertaine.

Des études sérologiques, de plus en plus complètes, ont permis de mettre en évidence des associations significatives entre ces autoanticorps et les différentes connectivites :

Anticorps associés à une entité clinique

• Les anticorps anti-SSA et anti-SSB

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 Disséminé (LED). L'anti-SS-A est également fréquemment retrouvé chez les mères d'enfant ayant présenté un bloc auriculo-ventriculaire néonatal.

• Les anticorps anti-RNP

- ✓ Un premier type d'anticorps est dirigé contre la protéine U1 snRNP de 70 kDa. Ces anticorps sont pathognomoniques des Connectives mixtes (MCTD) mais peuvent être aussi présents dans le Lupus Erythémateux Disséminé (LED). Ces anticorps se retrouvent à des titres élevés dans le Syndrome de Sharp.
- ✓ Un second type est dirigé contre les protéines Sm et U1 -snRNP (70 kDa, A et C). Ces anticorps sont présents dans le Lupus Erythémateux Disséminé (LED), les Sclérodermies et les Polymyosites.

Anticorps associés à une connectivite précise

- **Les anticorps anti-Sm** sont dirigés contre les unités (B,B\ D1-D3, E, F, G) de la ribonucléoprotéine snRNPs. Les anticorps anti-Sm comme les anticorps anti-ADN natif sont très spécifiques du Lupus Erythémateux Disséminé (LED) et appartiennent aux critères de diagnostic et de classification du LED.
- **Les anticorps anti-Scl-70** sont dirigés contre l'ADN topoisomérase I. Ils sont hautement spécifiques de la Sclérodermie proximale diffuse et associés à une évolution sévère de la maladie.
- **Les anticorps anti-Jo1** sont dirigés contre l'histidyl-ARNt synthétase (protéine cytoplasmique intervenant dans la biosynthèse des protéines) et sont présents chez 20 à 40 % des patients atteints de Polymyosite et de Dermatomyosite.
- **Les anticorps anti-Centromère (CENP-B)** sont le plus souvent retrouvés chez des patients présentant une Sclérodermie à localisation cutanée restreinte, désignée par le Syndrome de CREST.

PRINCIPE DU TEST



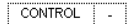


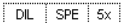
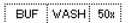

Chaque antigène nucléaire soluble est individuellement coâté sur le support solide constitué de 12 barrettes de 8 micropuits en polystyrène.


- 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 autoanticorps impliqués vont se fixer à un ou plusieurs antigènes correspondants. Après incubation, les anticorps non fixés sont éliminés par lavage.
- Un conjugué monoclonal anti-IgG humaine couplé à la peroxydase de Raifort est ensuite rajouté à chaque puits. Il 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 : TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps présente dans l'échantillon.
- L'addition de HCl (1 M) permet de bloquer la réaction enzymatique.
- La lecture des densités optiques à 450nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.
- L'intensité de la coloration du chromogène est proportionnelle à la quantité de conjugué liée au complexe anticorps-antigène et donc proportionnelle à la concentration initiale en autoanticorps du patient.

ECHANTILLONS

- Le test doit être réalisé sur du sérum. Utiliser de préférence des échantillons de sérum fraîchement prélevés. Les prélèvements doivent suivre les recommandations nationales.
- 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 au maximum. Au-delà, ils devront être congelés à -20°C.
- 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.

RÉACTIFS

Microplaque de 96 puits sensibilisés avec les antigènes recombinants : 70 kDa U1-snRNP, SS-B, SS-A 52 kDa, Scl-70, CENP-B, Jo-1 et les antigènes humains purifiés snRNP/Sm, Sm and SS-A 60 kDa (12x8 puits individuels sécables) 	12 barrettes
2 flacons d'Etalon Seuil (bouchon bleu: solution jaune) contenant du sérum humain dilué et de l'azide de sodium < 0.1% (agent de conservation) <u>Prêt à l'emploi</u> 	2 x 1,8ml
2 flacons de Contrôle Négatif (bouchon vert: solution jaune) contenant du sérum humain dilué et de l'azide de sodium < 0.1% (agent de conservation) <u>Prêt à l'emploi</u> 	2 x 1,8ml
1 flacon de Conjugué anti-IgG- humaine couplé à la peroxydase (bouchon bleu: solution bleue) <u>Prêt à l'emploi</u> 	1 x 15ml
1 flacon de Substrat TMB (bouchon noir) composé de TMB/H ₂ O ₂ stabilisé. <u>Prêt à l'emploi</u> 	1 x 15ml
1 flacon de Diluant échantillon – concentré x5 (bouchon blanc: solution jaune) composé de Tris, de NaCl, de Sérum albumine bovine et d'azide de sodium < 0.1% (agent de conservation) <u>A diluer</u> 	1 x 20ml
1 flacon de Tampon de Lavage – concentré x50 (bouchon blanc: solution verte) composé de Tris, de NaCl, de Tween 20 et d'azide de sodium < 0.1% (agent de conservation) <u>A diluer</u> 	1 x 20ml
1 flacon de Solution d'arrêt (bouchon blanc: solution incolore) contenant HCl (1M) <u>Prêt à l'emploi</u> 	1 x 15ml

Les coffrets **ELISIS ENA Profile** () sont standardisés par rapport aux sérums de référence du CDC (Centers for Disease Control and Prevention) à Atlanta. Les résultats sont exprimés en UA/ml.

STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- 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.
- Après la première ouverture, conserver tous les réactifs entre +2°C et +8°C.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Eau purifiée (selon les exigences de la Pharmacopée des Etats Unis ou de la Pharmacopée européenne)
- Lecteur de microplaque avec filtre de 450nm et filtre de référence optionnel de 620nm (600-690nm)
- Eprouvettes (100-1000ml)
- Tubes à hémolyse pour les dilutions de sérum
- Vortex
- Pipettes de précision capables de délivrer précisément de 10µl à 1000µl ou distributeur répétitif capable de délivrer précisément de 100µl à 1000µl
- Laveur de microplaque (pipettes répétitives ou pipettes multicanaux ou système automatisé capables de délivrer précisément 300µl)
- Papier absorbant

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

L'ensemble des réactifs doit être préparé extemporanément.

1. Préparation de la Solution « Diluant d'échantillon »

- Diluer la Solution « Diluant d'échantillon » concentrée au 1/5 en eau distillée.
Ex: 20ml dans 80ml
- Durée de conservation : 1 mois entre +2°C et +8°C.

2. Préparation du tampon de lavage

- Diluer le tampon de lavage concentré au 1/50 en eau distillée.
Ex: 20ml dans 980ml
- Préparer 20ml de tampon de lavage dilué pour 8 puits ou 200ml pour 96 puits.
- Durée de conservation : 1 mois entre +2°C et +8°C.

3. Préparation des échantillons

- Diluer les échantillons au 1/101 dans la solution de Diluant d'échantillon (x1).
Ex: 1000µl de Diluant d'échantillon (1x) + 10µl de sérum
- Agiter vigoureusement aux vortex.

4. Etape de lavage

- ❖ Lavage automatisé :
- Pour le calcul du volume de tampon de lavage, prendre en considération les volumes nécessaires pour la préparation des instruments ainsi que les volumes morts des pipettes.
- ❖ Lavage manuel :
- Vider les puits par retournement de la plaque.
- Tamponner vigoureusement la plaque retournée sur un papier absorbant.
- Distribuer 300µl de tampon de lavage dilué (x1) dans chaque puits et attendre 20 secondes.
- Répéter entièrement la procédure deux fois.

5. Microplaques

- Déterminer le nombre de puits exact nécessaire au test.
- Replacer les puits, non utilisés à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet déshydratant et les remettre immédiatement entre +2°C et +8°C.

PRÉCAUTIONS

Ramener tous les réactifs et les échantillons impérativement à température ambiante (+18°C/+25°C) avant utilisation.

S'assurer que les plaques soient bien égoutées après chaque lavage.

Ne pas fumer, ne pas manger ou boire en manipulant le kit.

Ne pas pipetter à la bouche.

L'étalon seuil et le contrôle sont d'origine humaine. Pour chacun, les recherches d'anticorps anti-VIH 1 et 2, anti-VCH et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. Toutefois s'agissant de produits potentiellement infectieux, il est nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.

Ce coffret contient des composants potentiellement dangereux qui ne sont pas classifiés comme irritant pour les yeux et la peau. Toutefois, il est recommandé d'éviter le contact avec les yeux et la peau et de porter des gants jetables.

L'étalon seuil, le contrôle et les tampons contiennent moins de 0.1% (w/v) d'azide de sodium. 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 et de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

Le coffret **ELISIS ENA Profile** ([bmd](#)) 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.

ELISIS ENA Profile ([bmd](#)) 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.

Ne pas mélanger, ni substituer les réactifs ou microplaques de lots différents, car cela pourrait entraîner des variations de résultats.

Incubation: pour les systèmes automatisés, il est recommandé de réaliser le protocole à +30°C.

Ne jamais exposer les réactifs à une température supérieure à +37°C.

Pipeter toujours le Substrat et le Conjugué avec des cônes non souillés.

Protéger le Substrat de la lumière.

MODE OPÉRATOIRE

1. Préparation du test

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

Retirer le nombre exacte de puits nécessaires et replacer les puits non utilisés dans la pochette de protection avec le sachet déshydratant.

Prévoir :

- Etalon seuil (Ctrl Ref)
- Contrôle négatif (Ctrl -)
- Echantillons dilués (S)

U1-RNP	A	Ctrl Ref	Ctrl-	S1	S2	S3								
SnRNP/Sm	B	Ctrl Ref	Ctrl-	S1	S2	S3								
Sm	C	Ctrl Ref	Ctrl-	S1	S2	S3								
SS-A 52/60	D	Ctrl Ref	Ctrl-	S1	S2	S3								
SS-B	E	Ctrl Ref	Ctrl-	S1	S2	S3								
Scl-70	F	Ctrl Ref	Ctrl-	S1	S2	S3								
CenpB	G	Ctrl Ref	Ctrl-	S1	S2	S3								
Jo-1	H	Ctrl Ref	Ctrl-	S1	S2	S3								

2. Incubation des échantillons

Déposer 100µl d'Etalon seuil et 100µl de Contrôle négatif dans les puits identifiés.

Déposer 100µl d'Echantillons dilués.

Incuber 30 minutes à température ambiante (+20°C/+32°C)

Etape de lavage:

Vider les puits par retournement de la microplaque.

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

3. Incubation du conjugué

Déposer 100µl de Conjugué dans tous les puits.

Incuber 30 minutes à température ambiante (+20°C/+32°C)

Etape de lavage:

Vider les puits par retournement de la microplaque.

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

4. Incubation du substrat

Déposer 100µl de Substrat TMB dans tous les puits.

Incuber 30 minutes à température ambiante (+20°C/+32°C)

Protéger les puits de la lumière intense.

5. Arrêt de la réaction

Déposer 100µl de Solution d'arrêt dans chaque puits.

Incuber au minimum 5 minutes.

Agiter délicatement la microplaque pendant 5 secondes.

6. Lecture

Lire la densité optique de chaque puits à 450nm au cours des 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction (des filtres 450/620nm peuvent être éventuellement utilisés).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lire la densité optique de l'étalon seuil et des échantillons patients. Multiplier l'Etalon seuil par le coefficient spécifique au paramètre, indiqué dans le certificat d'analyse spécifique à chaque lot. Comparer la densité optique obtenue pour les échantillons patients à celle de l'Etalon seuil pour le paramètre à calculer. Les échantillons patients ayant une densité optique supérieure à celle de l'étalon seuil sont considérés positifs.

DO de l'Etalon seuil x coefficient spécifique à l'antigène = DO seuil pour le paramètre

DO Patient < DO étalon seuil pour le paramètre => **Négatif**

DO Patient > DO étalon seuil pour le paramètre => **Positif**

Etalon Seuil et Contrôles	DO 450/620nm	CV % (Variation)
Contrôle négatif	0,047	2,6
Etalon seuil	0,350	1,8

Exemple d'interprétation

Il est recommandé de tester l'Étalon seuil au cours de chaque série d'essais.

Coefficient pour le paramètre U1-snRNP70kD = 1,0

DO Etalon seuil pour le paramètre U1-snRNP70kD = 0,550 x 1.0 = 0,550

DO Echantillon patient = 0,999 > 0,550 = positif

Ne pas utiliser cet exemple pour interpréter vos résultats !

[bmd](#) recommande de retester les échantillons équivoques.

Les données spécifiques de chaque lot sont indiquées dans les certificats d'analyse joints.

Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs de plage (normale) de référence, en fonction de ses techniques, de ses contrôles, de ses équipements et de sa population de patients.

Pour une interprétation semi-quantitative, chaque valeur de densité optique peut être exprimée en index. L'index est calculé en divisant la densité optique de l'échantillon patient par celle obtenue pour l'étalon seuil :

$$\frac{\text{DO (Echantillon patient)}}{\text{DO (Etalon seuil)}} = \text{Index}$$

Index < 1.0 => Négatif
Index > 1.0 => Positif

Le diagnostic clinique définitif ne doit pas être uniquement basé sur les résultats obtenus avec ce test, mais il doit résulter de l'interprétation du contexte clinique et des examens complémentaires. Différentes méthodes de diagnostic doivent être associées pour établir le diagnostic définitif.

LIMITES

Les sérums hémolysés, lipémiques, ictériques ou bactériologiquement contaminés peuvent entraîner des résultats faussement positifs.

CONTROLE QUALITÉ

Le coffret contient un contrôle négatif. Il est conseillé de le doser au cours de chaque série réalisée.

[bmd](#) propose des contrôles multiparamétriques externes qui peuvent être testés en parallèle (IMMUNO-TROL IV, réf : HM051 ; IMMUNO-TROL V, réf : HM052). Ces contrôles sont à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

Sensibilité, spécificité et concordance

ELISIS ENA Profile ([bmd](#)) a été comparé à un coffret ELISA commercialisé.

L'étude a porté sur 340 échantillons associés à la présence de maladies systémiques autoimmunes.

Résultats

Spécificité antigénique	Sensibilité relative (%)	Spécificité relative (%)	Concordance (%)
U1-snRNP70kD	87,0	100	95,8
snRNP/Sm	96,2	97,9	97,0
Sm	96,0	94,2	95,1
SS-A 52 + 60 kDa	80,3	95,8	84,7
SS-B	84,7	100	91,1
Scl-70	100	94,3	97,1
Centromère	96,1	98,1	97,1
Jo-1	100	100	100

Précision du test

Estimée sur 3 échantillons positifs pour chaque paramètre : faiblement positif, positif et fortement positif.

	ELISIS ENA Profile			
	Intra-essai (24 tests dans le même essai)		Inter-essais (18 tests dans 3 essais différents)	
	Titres moyens UA/ml	CV (%)	Titres moyens UA/ml	CV (%)
U1-snRNP70kD	151	2,3	148	2,6
	72	3,6	70	4,1
	26	4,5	24	3,9
snRNP/Sm	85,1	6,2	83,6	6,4
	50,5	3,3	51,3	3,7
	19,1	1,0	19,1	1,6
Sm	64,2	4,6	50,4	3,3
	41,5	3,3	29,6	2,3
	20,4	1,9	12,7	1,4
SS-A 52 + 60 kDa	78,2	8,1	102,4	3,8
	44,3	2,8	62,5	5,5
	22,9	2,0	26,3	1,9
SS-B	87,0	6,0	88,5	5,2
	55,5	3,1	58,9	4,2
	20,7	1,8	21,6	1,8
Scl-70	66,5	7,7	57,5	4,4
	37,7	4,3	52,2	4,2
	19,4	1,9	17,7	1,3
Centromère	265	1,5	261	1,4
	122	2,3	119	2,5
	44	4,1	46	3,8
Jo-1	112,9	9,3	112,9	9,3
	63,3	7,5	63,3	7,5
	15,3	1,0	15,3	1,0

Seuil de positivité

Estimé sur 40 échantillons issus de donneurs sains.

	ELISIS ENA Profile
Seuil de positivité : valeur moyenne +3 écart-types	15 UA/ml

BIBLIOGRAPHIE

CONRAD K. et al.

Autoantibodies – Diagnostic, pathogenic and prognostic relevance.

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

GAL I et al.

Comparison of anti-Ro/SSA antibody profile between patients with primary and secondary syndrome.

Autoimmunity 2000; Sep 32, 2, 89-92.

HERVE L., ANDRE C.

Evaluation d'une technique ELISA pour la détection des anticorps anti-SSA/Ro. Comparaison avec la technique de référence. Anticorps anti-SSA/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.

RAHMAN MA et al.

Autoantibodies in systemic lupus erythematosus.

Curr Opin Rheumatol 1994, (6), 468-473.

SMEENK RJ et al.

dsDNA autoantibodies.

In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, 1996, Amsterdam.227-234.

SPENCER GREEN G. et al.

Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl70 antibodies.

Am. J. of Med., 1997, 18, 291-300.

THE LS et al.

Antiribosomal P protein antibodies in systemic lupus erythematosus.



















Arthritis Rheum. 1994, (37), 307-315.

SCHEMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

	QUANTITÉ À DISTRIBUER	RÉACTIFS	CONDITIONS D'INCUBATION
INCUBATION	100µl 100µl 100µl	Etalon seuil Contrôle négatif Echantillons dilués	30 min à TA
LAVAGE	Laver 3 fois en tampon de lavage (300µl/puits)		
INCUBATION DU CONJUGUÉ	100µl	Conjugué anti-IgG-HRP humaine	30 min à TA
LAVAGE	Laver 3 fois en tampon de lavage (300µl/puits)		
RÉACTION ENZYMATIQUE	100µl	Substrat TMB	30 min à TA À protéger de la lumière intense
ARRÊT DE LA RÉACTION	100µl	Solution d'arrêt (1M HCl)	5 min

TA: température ambiante (+20°C/+32°C)

SYMBLES UTILISÉS

	Risques biologiques		Limites de température		Référence catalogue
	Consulter les instructions d'utilisation		Dispositif medical de diagnostic in vitro		Code du lot
	Nombre de tests		A utiliser jusque		Déclaration de conformité CE
	Diluant échantillon		Solution Stop		Etalon de référence
	Tampon de lavage		Calibrateur		Microplaque
	Contrôle		Substrat		Conjugué

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



ELISIS ENA Profile

REF LIS 1101



DEFINITION

ELISIS ENA Profile kit ([bmd](#)) is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the qualitative determination of 8 antibodies in human samples. The wells are separately coated with U1-snRNP, snRNP/Sm, Sm, SS-A (52 and 60 kDa), SS-B, Scl-70, CENP-B and Jo-1.

The results of the **ELISIS ENA Profile kit** ([bmd](#)) are to be used in conjunction with the clinical findings and the other laboratory tests to aid in the diagnosis of connective diseases (systemic lupus erythematosus (SLE), Sjogren's syndrome, mixed connective tissue disease (MCTD), scleroderma, dermatomyositis and CREST syndrome).

ELISIS ENA Profile kit ([bmd](#)) may be used with the **CARIS™ system** (diluting and dispensing device).

DIAGNOSTIC VALUE

Connective diseases are systemic auto-immune diseases and each one is, most often, selectively directed against a specific organ. Their classification is based upon clinical and biological data. The detection of anti-nuclear antibodies, which often appears in the patient serum before any definite symptomatic sign, allows the identification of the specific connective disease.

Many elaborate serological studies have demonstrated significant associations between these autoantibodies and the various connective diseases:

Antibodies associated with different autoimmune pathologies

• **Anti-SSA and anti-SSB antibodies**

Either one or both of these are observed in two pathologies: Sjögren's syndrome and Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Anti-SSA antibodies are also found in mothers who are carrying a baby with neonatal lupus syndrome including heart block.

• **Anti-RNP antibodies**

- ✓ Antibody against U1 snRNP is directed to the 70 kDa protein of U1 snRNP. They are pathognomic for MCTD but do also occur in SLE. A high titer of antibodies against this antigen is typical for the Sharp-Syndrome.
- ✓ Antibody against snRNP/Sm are directed against Sm and U1 -snRNP proteins (70 kDa, A and C). They occur in SLE, Sjögren's syndrome, scleroderma and polymyositis.

Antibodies specific to a single connective tissue disease

- **Anti-Sm antibodies** are directed against core proteins (B,B\ D1-D3, E, F, G) of small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs). Anti-Sm as well as antibodies against double stranded DNA (dsDNA) are highly specific for SLE and thus are included in diagnostic and classification criteria for SLE.
- **Anti-Scl-70 antibodies** are directed against DNA-topoisomerase I. They are highly specific for systemic scleroderma and give a hint for a severe course.
- **Anti-Jo1 antibodies** are directed against histidyl-tRNA synthetase (cytoplasmic protein involved in protein biosynthesis) and are found in 20-40 % of patients with polymyositis and dermatomyositis.
- **Anti-Centromere antibodies (CENP-B)** are most often found in sera from patients having Scleroderma with limited skin involvement CREST, called CREST syndrome.

ASSAY PRINCIPLE

Each different extractable nuclear antigen is coated onto specific 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 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 TMB substrate (3,3',5,5' - tetramethylbenzidine). During this step, a colour will develop in proportion to the amount of antibodies in the sample.
- Addition of Stop Solution HCL (1 M) serves to stop the enzymatic reaction.
- After stopping the reaction by HCL (1 M) the optical density is read by a spectrophotometer at 450nm
- A control calibrator allows to express in arbitrary units the titre of the patient sample.
- The rate of color formation from the chromogen is a function of the amount of conjugate bound to the antigen-antibody complex and this is proportional to the initial concentration of the respective antibodies in the patient sample.

SAMPLES COLLECTION AND HANDLING

- The test should be performed on serum. Use preferentially freshly collected serum samples. Blood withdrawal must follow national requirements.
- 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.

REAGENTS

96 wells microplate coated with recombinant 70 kDa U1-snRNP, SS-B, SS-A 52 kDa, Scl-70, CENP-B, Jo-1 and purified native human snRNP/Sm, Sm and SS-A 60 kDa (12x8 individual breakaway microwells)	12 strips
2 vials of Cut-off Calibrator (capped blue: yellow solution) containing: human serum (diluted), sodium azide < 0.1% (preservative) Ready to use	2 x 1.8mL
2 vials of Negative control (capped green: yellow solution) containing: human serum (diluted), sodium azide < 0.1% (preservative) Ready to use	2 x 1.8mL
1 vial of anti-human IgG-HRP Conjugate (capped blue: blue solution) Ready to use	1 x 15mL
1 vial of TMB Substrate (capped black) containing: stabilized TMB/H ₂ O ₂ Ready to use	1 x 15mL
1 vial of Sample Diluent - 5x concentrated (capped white: yellow solution) containing: Tris, NaCl, BSA, sodium azide < 0.1% (preservative) To dilute	1 x 20mL
1 vial of Wash Buffer - 50x concentrated (capped white: green solution) Containing: Tris, NaCl, Tween 20, sodium azide < 0.1% (preservative) To dilute	1 x 20mL
1 vial of Stop Solution (capped white: colorless solution) containing: 1M Hydrochloric Acid Ready to use	1 x 15mL

ELISIS ENA Profile kit ([bmd](#)) is calibrated against reference sera from the CDC (Centres for Disease Control and Prevention) Atlanta. The results are expressed in AU/mL.

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.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Purified water (according to the definition of the United States Pharmacopeia and the European Pharmacopeia)
- Microtiter plate reader 450nm reading filter and optional 620nm reference filter (600-690nm)
- Glass ware (cylinder 100-1000ml)
- Test tubes for serum dilutions
- Vortex mixer
- Precision pipettes (10, 100, 200, 500, 1000µl) or adjustable multipipette (100-1000ml)
- Microplate washing device (300µl repeating or multichannel pipette or automated System)
- Adsorbent paper

SETUP

All the reagents should be prepared as required:

1. Preparation of Sample diluent solution

- Dilute concentrated Sample diluent 1/5 in distilled water.
Ex: 20mL plus 80mL
- Storage period: 1 month at +2°C/+8°C.

2. Preparation of wash buffer

- Dilute concentrated Wash buffer 1/50 in distilled water.
Ex: 20mL plus 980mL
- Prepare 20mL of diluted wash buffer for 8 wells or 200mL for 96 wells
- Storage period: 1 month at +2°C/+8°C.

3. Preparation of samples

- Dilute to 1/101 in Sample diluent (1x)
Ex: 1000µl sample diluent (1x) + 10 µl serum
- Shake vigorously at the vortex.

4. Automated washing:

- Consider excess volumes required for setting up the instrument and dead volume of robot pipette.

5. Manual washing:

- Discard liquid from wells by inverting the plate.
- Knock the microwell frame with wells downside vigorously on clean adsorbent paper.
- Pipette 300µl of diluted wash buffer into each well, wait for 20 seconds.
- Repeat the whole procedure twice again.

6. Microplates

- Calculate the number of wells required for the test.
- Remove unused wells from the frame, replace and store in the provided plastic bag, together with desiccant, seal tightly (+2°C/+8°C).

PRECAUTIONS

Allow all reagents and samples to come to room temperature (+18°C / +25°C) before handling.

Check that all plates are well drained after each wash.

Do not smoke, eat or drink when manipulating the kit.

Do not pipette by mouth.

Human sources for the preparation of calibrator and control 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.

This kit contains potentially hazardous components. Though kit reagents are not classified being irritant to eyes and skin we recommend to avoid contact with eyes and skin and wear disposable gloves.

Calibrator, Control and Buffer contain less of 0.1% (w/v) sodium azide. Do not eat and avoid contact with skin and eyes. This substance can form explosive mixtures in copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.

ELISIS ENA Profile kit ([bmd](#)) has been developed according CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labeling of dangerous preparations.

ELISIS ENA Profile kit ([bmd](#)) 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.

Do not mix or substitute reagents or microplates from different lot numbers. This may lead to variations in the results.

Incubation: We recommend test performance at +30°C for automated Systems.

Never expose components to higher temperature than +37°C.

Always pipette substrate solution with brand new tips only. Protect this reagent from light. Never pipette conjugate with tips used with other reagents prior.

METHOD

1. Preparing the test

Use the work sheet to note the sample locations.

Detach the exact number of wells needed and return unused wells to plastic pouch provided in the kit, with the desiccant bag.

Set out:

- Cut-off calibrator (Ctrl Ref)
- Negative control (Ctrl -)
- Patient samples (S)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
U1-RNP	A	Ctrl Ref	Ctrl -	S1	S2	S3						
SnRNP/Sm	B	Ctrl Ref	Ctrl -	S1	S2	S3						
Sm	C	Ctrl Ref	Ctrl -	S1	S2	S3						
SS-A 52/60	D	Ctrl Ref	Ctrl -	S1	S2	S3						
SS-B	E	Ctrl Ref	Ctrl -	S1	S2	S3						
Scl-70	F	Ctrl Ref	Ctrl -	S1	S2	S3						
CenpB	G	Ctrl Ref	Ctrl -	S1	S2	S3						
Jo-1	H	Ctrl Ref	Ctrl -	S1	S2	S3						

2. Sample incubation

Add 100µL of Cut-off calibrator and Negative control into the designated microwells

Add 100µL of Samples.

Incubate for 30 minutes at room temperature (+20°C/+32°C)

Wash step:

Remove the contents of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300µL of washing buffer

3. Incubation of conjugate

Add 100µL of Conjugate

Incubate for 30 minutes at room temperature (+20°C/+32°C)

Wash step:

Remove the contents of the wells by rapid inversion

Wash 3 times with 300µL of washing buffer

4. Incubation of substrate

Add 100µL TMB Substrate into each well

Incubate for 30 minutes at room temperature (+20°C/+32°C)

Protect the wells from intense light

5. Stop solution

Add 100µL of Stop solution into each well

Incubate for 5 minutes minimum

Agitate plate carefully for 5 sec.

6. Reading

Read the optical density of each well at 450nm (optionally 450/620 nm) within 30 minutes.

INTERPRETATION OF RESULTS

Read the optical density of the cut-off control and the patient samples. Multiply the OD of the cut-off calibrator by the parameter specific factor, provided with the lot specific QC certificate. Compare patient ODs with the calculated parameter OD cut-off value. All samples which are higher than cut-off are considered positive.

OD Cut-off calibrator x antigen specific factor = OD Cut-off parameter.

Negative:	OD	Patient	<	OD cut-off
Positive:	OD	Patient	>	OD cut-off

Calibrators	OD 450/620 nm	CV % (Variation)
Negative Control	0.047	2.6
Cut-off Calibrator	0.350	1.8

Example of interpretation

We recommend pipetting cut-off calibrator in parallel for each run.

U1-snRNP70kD Factor= 1.0

OD Cut-off calibrator 0.550 x 1.0 = 0.550

OD patient 0.999 > 0.550 = positive

Do not use this example for interpreting patients results!

bmd recommend to retest samples that are equivocal.

For lot specific data, see enclosed quality control leaflet.

Each laboratory should establish its own normal range based upon its own techniques, controls, equipment and patient population according to their own established procedures.

For **semi-quantification of the results**, each patient-OD value can be expressed by the Index-Value. The Index-Value is calculated by dividing the patient-OD by the cut-off OD:

$$\text{Index Value} = \frac{\text{OD (patient sample)}}{\text{OD (cut-off calibrator)}}$$

Negative => Index Value < 1.0

Positive => Index Value > 1.0

A definite clinical diagnosis should not be based on the results of the performed test only, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated.

The diagnosis is to be verified using different diagnostic methods.

LIMITATION

Hemolytic, lipemic, icteric samples or contaminated samples with may confound the results of this assay.

QUALITY CONTROL

The kit contains a negative control. The negative control should be included with each run of the test.

bmd offers an external multiparameter quality control (IMMUNO-TROL IV, Cat: HM051; IMMUNO-TROL V, Cat: HM052). These controls should be handled as samples.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCES OF THE TEST

Sensitivity, specific affinity and agreement to other methods

ELISIS ENA Profile kit has been compared to one predicate ELISA kit.

The study was performed on 340 samples from patients with associated systemic auto-immune diseases.

Results

Antigenic specificity	Relative sensitivity (%)	Relative specificity (%)	Concordance (%)
U1-snRNP70kD	87.0	100	95.8
snRNP/Sm	96.2	97.9	97.0
Sm	96.0	94.2	95.1
SS-A 52 + 60 kDa	80.3	95.8	84.7
SS-B	84.7	100	91.1
Scl-70	100	94.3	97.1
Centromère	96.1	98.1	97.1
Jo-1	100	100	100

Test Precision

Estimated for each parameter on three positive samples : strongly, moderate and weakly positive.

	ELISIS ENA Profile			
	Intra-assay (24 tests in a same assay)		Inter-assay (18 tests in 3 differents assays)	
	Titer mean AU/mL	CV (%)	Titer mean AU/mL	CV (%)
U1-snRNP70kD	151	2.3	148	2.6
	72	3.6	70	4.1
	26	4.5	24	3.9
snRNP/Sm	85.1	6.2	83.6	6.4
	50.5	3.3	51.3	3.7
	19.1	1.0	19.1	1.6
Sm	64.2	4.6	50.4	3.3
	41.5	3.3	29.6	2.3
	20.4	1.9	12.7	1.4
SS-A 52 + 60 kDa	78.2	8.1	102.4	3.8
	44.3	2.8	62.5	5.5
	22.9	2.0	26.3	1.9
SS-B	87.0	6.0	88.5	5.2
	55.5	3.1	58.9	4.2
	20.7	1.8	21.6	1.8
Scl-70	66.5	7.7	57.5	4.4
	37.7	4.3	52.2	4.2
	19.4	1.9	17.7	1.3
Centromere	265	1.5	261	1.4
	122	2.3	119	2.5
	44	4.1	46	3.8
Jo-1	112.9	9.3	112.9	9.3
	63.3	7.5	63.3	7.5
	15.3	1.0	15.3	1.0

Threshold value

Calculated on 40 samples from « blood donors ».

	ELISIS ENA Profile
Cut-off : Mean value +3SD	15 AU/mL

REFERENCES

CONRAD K. et al.

Autoantibodies – Diagnostic, pathogenic and prognostic relevance.

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

GAL I et al.

Comparison of anti-Ro/SSA antibody profile between patients with primary and secondary syndrome.

Autoimmunity 2000; Sep 32, 2, 89-92.

HERVE L., ANDRE C.

Evaluation d'une technique ELISA pour la détection des anticorps anti-SSA/Ro. Comparaison avec la technique de référence. Anticorps anti-SSA/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.

RAHMAN MA et al.

Autoantibodies in systemic lupus erythematosus.

Curr Opin Rheumatol 1994, (6), 468-473.

SMEENK RJ et al.

dsDNA autoantibodies.

In: Peter JB and Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, 1996, Amsterdam.227-234.

SPENCER GREEN G. et al.

Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl70 antibodies.

Am. J. of Med., 1997, 18, 291-300.

THE LS et al.

Antiribosomal P protein antibodies in systemic lupus erythematosus.

















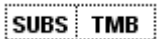

Arthritis Rheum. 1994, (37), 307-315.

SUMMARY OF METHOD

	AMOUNT TO BE DISTRIBUTED	REAGENTS	INCUBATION CONDITIONS
INCUBATION OF SAMPLES	100µL 100µL 100µL	Cut-off calibrator (in duplicate) Negative Control (in duplicate) Diluted samples (in duplicate)	30 min at RT
WASHING	Wash 3 times with washing buffer (300µL/ well)		
INCUBATION OF CONJUGATE	100µL	Anti-human IgG-HRP conjugate	30 min at RT
WASHING	Wash 3 times with washing buffer (300µL/ well)		
ENZYME REACTION	100µL	TMB Substrate	30 min at RT protected from intense light
STOP REACTION	100µL	Stop solution (1M HCl)	5 min

RT: room temperature (+20°C/+32°C)

SYMBOLS USED

	Biological risks		Temperature limitation		Catalogue Number
	Consult instructions for use		In Vitro Diagnostic Medical Device		Batch Code
	Number of tests		Use by		EC Declaration of Conformity
	Sample Diluent		Stop Solution		Cut-off calibrator
	Wash Buffer		Calibrator		Microplate
	Control		Substrate		Conjugate

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