

FIDIS™ Connective 10

REF

MX 006

96

DÉFINITION

Le coffret **FIDIS™ Connective 10** constitue une méthode d'identification semi-quantitative d'autoanticorps sur supports particuliers utilisant un système de détection par cytométrie de flux. Il permet la recherche simultanée de 10 spécificités : **ADN double brin (dsDNA), SS-A 60 kDa, TRIM21*** (*précédemment nommé **SS-A 52 kDa**), **SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, ribosomes et centromère.**

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les connectivites sont des maladies auto-immunes systémiques qui sont chacune principalement, dirigées 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. Le titre de certains autoanticorps, notamment les anti-dsDNA, constitue un élément important dans le suivi de l'évolution de la maladie et du traitement.

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

Anticorps anti-SS-A (SS-A 60kDa, TRIM21) 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 Disséminé (LED). L'anti-SS-A est également fréquemment 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

Anticorps anti-dsDNA qui constituent le marqueur sérologique le plus fréquent et le plus spécifique du LED.

Anticorps anti-Sm caractéristique des formes graves de LED.

Anticorps anti-ribosomes, dont l'intérêt réside dans leur forte association aux localisations neurologiques centrales du LED.

Anticorps anti-Scl-70 spécifiques de la Sclérodémie proximale diffuse.

Anticorps anti-Jo-1 retrouvés 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.

PRINCIPE DU TEST

FIDIS™ Connective 10 repose sur l'utilisation de microsphères de taille uniforme différemment colorées et d'un cytomètre de flux interfacé avec un système informatique de digitalisation et de traitement du signal. Une diode rouge du cytomètre de flux, en classant chaque catégorie de microsphères sur la base de sa fluorescence unique (du rouge à l'orange), permet l'identification du paramètre analysé. Parallèlement un laser excite la fluorescence d'un composé secondaire pour quantifier la réaction spécifique qui y est associée.

Chaque antigène nécessaire à la réalisation du test (antigènes recombinants : **dsDNA, SS-B, TRIM21, CENP-B, Jo-1** et antigènes purifiés : **Scl-70, smRNP, Sm, ribosome et SS-A 60 kDa**) est couplé à une catégorie de microsphères colorées. Les différentes catégories sont ensuite mélangées pour constituer le réactif final, support des réactions immunologiques spécifiques avec les différents autoanticorps recherchés.

Le coffret **FIDIS™ Connective 10** permet de détecter 10 anticorps spécifiques : les anticorps **anti-ADN double brin (dsDNA), anti-SS-A 60 kDa, anti-TRIM21** (*précédemment nommé **SS-A 52 kDa**), **anti-SS-B, anti-Sm, anti-Sm/RNP, anti-Scl-70, anti-Jo-1, anti-ribosomes et anti-centromère.**

Le test est réalisé dans une microplaque de filtration de 96 puits.

- Au cours d'une première étape, les échantillons dilués des patients à tester sont incubés en présence des microsphères sensibilisées par les **antigènes ADN double brin (dsDNA), SS-A 60 kDa, TRIM21, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, ribosomes et centromère.** Si l'échantillon contient un ou plusieurs anticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer au(x) antigène(s) correspondant(s), sur les différentes catégories de microsphères.
- Après incubation, une étape de lavage par filtration permet d'éliminer les éléments non fixés.
- Un anticorps secondaire conjugué à la phycoérythrine dirigé contre les immunoglobulines humaines **d'isotype IgG** permet de révéler les anticorps précédemment capturés.
- Une étape finale de lavage stoppe la réaction et permet d'éliminer les anticorps conjugués non liés.
- La réaction est alors mesurée par le cytomètre de flux qui identifie chaque type de microsphères et mesure la fluorescence moyenne des conjugués fixés.
- Un système de calibration permet, par interpolation, de définir la valeur de l'échantillon en unité arbitraire (UA/ml) sur chacune des spécificités antigéniques suivantes : **SS-A 60 kDa, TRIM21, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, ribosomes et centromère** et en unité internationale (UI/ml) pour le **dsDNA.** Les coffrets **FIDIS™ Connective 10** peuvent être utilisés avec l'automate de dilution/répartition **CARIS™.**

ÉCHANTILLONS

- Utiliser du 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. 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.

COMPOSITION DU COFFRET

| | |
|---|-------------|
| Plaquette de 96 micropuits à membrane filtrante munie d'un couvercle. MP | 1 plaquette |
| Flacon (A) de 10 catégories de microsphères colorées sensibilisées par les antigènes : <i>dsDNA</i> , <i>SS-A 60kDa</i> , <i>TRIM21</i> , <i>SS-B</i> , <i>Sm</i> , <i>Sm/RNP</i> , <i>Scl-70</i> , <i>Jo-1</i> , <i>ribosomes</i> et <i>centromère</i> . MICROSPHERES <i>Lyophilisées</i> (à reconstituer avec le tampon D) | qsp 6ml |
| Flacon (B1) tampon de dilution des échantillons (flacon blanc) <i>Prêt à l'emploi</i> DIL SPE | 2 x 115ml |
| Flacon de calibrateur* <i>Prêt à l'emploi</i> Les titres sont indiqués sur l'étiquette du flacon. CAL | 1 x 1,5ml |
| Flacon de contrôle positif donnant une réactivité standardisée et constituant un contrôle de réaction destiné à vérifier l'activité des réactifs et le bon fonctionnement de l'essai. CONTROL + <i>A diluer</i> Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon. | 1 x 250µl |
| Flacon de contrôle négatif <i>A diluer</i> CONTROL - | 1 x 250µl |
| Flacon de conjugué anti-IgG humaine couplé à la phycoérythrine. <i>Prêt à l'emploi</i> CONJ IgG | 1 x 12ml |
| Flacon (C1) de tampon de lavage (flacon noir) <i>Prêt à l'emploi</i> BUF WASH | 1 x 100ml |
| Flacon (D) de tampon de reconstitution des microsphères <i>Prêt à l'emploi</i> BUF MICROSPHERES | 1 x 6ml |

Les titres* du calibrateur sont exprimés en unités arbitraires par ml (UA/ml) excepté pour dsDNA.

Le titre* du calibrateur pour la spécificité dsDNA (UI/ml) est standardisé par rapport à la référence internationale : Wo/80 WHO.

MATÉRIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Pipettes de précision capables de délivrer précisément de 5µl à 1000 µl.
- Pipette multicanaux ou distributeur répétitif capables de délivrer précisément de 40µl à 300µl ou 5µl à 2 ml.
- Agitateur

- Chronomètre
- Sonicateur
- Papier absorbant
- Pipettes sérologiques
- Films pour microplaques

STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Remettre immédiatement entre +2°C et +8°C, les réactifs non utilisés.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

- Les réactifs en solutions 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.
- Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.
- Le coffret **FIDIS™ Connective 10** 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.
- **FIDIS™ Connective 10** 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.
- *Les contrôles et le calibrateur sont d'origine humaine. Pour chacun, les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2, anti-HCV et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.*
- Si toutes les spécificités sont retrouvées chez un même patient, il est conseillé de contrôler le prélèvement par une autre méthode.

PRÉPARATION DU TEST

Préparation de l'unité de filtration FIDIS™

☞ Vérifier les tuyaux reliant la pompe au support et le réglage du manomètre (molette totalement fermée).

Utilisation du système d'analyse FIDIS™ et du logiciel MLX-BOOSTER

☞ Se reporter au Manuel d'utilisation fourni avec le système **FIDIS™** pour effectuer les étapes de mise en route et de calcul. Pour toutes informations complémentaires et/ou résolution de problèmes, veuillez prendre contact auprès de bmd ou de votre distributeur.

- Commencer la série comme indiquée dans le Manuel d'utilisation.
N.B : L'appareil met 30 minutes pour chauffer après l'avoir allumé. Un nouveau préchauffage est nécessaire après 4 heures d'inactivité du système.
- Les étapes de calibration et de contrôles sont décrites dans le Manuel d'utilisation. Ces 2 étapes devront être exécutées régulièrement 1 fois/mois et à chaque nouveau lot de « Sheath fluid » afin d'assurer une performance optimale de l'appareil. L'étape de calibration doit également être effectuée si la température indiquée sur l'écran de la série du lot est en dehors de celle paramétrée.
- Programmer un lot ou une série de lots multiples sur FIDIS™ comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
- Placer la microplaque dans le support de plaques du système FIDIS™ comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
- Effectuer l'analyse des résultats comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
- A la fin de la dernière utilisation journalière de l'appareil, exécuter les opérations de lavage et de stérilisation avant d'arrêter le système d'analyse conformément aux instructions d'arrêt décrites dans le Manuel d'utilisation.

Préparation des réactifs

☞ Ramener l'ensemble des réactifs à **température ambiante** (+18°C/+25°C) avant de les préparer extemporanément.

1. Préparation des microsphères

- Reconstituer la solution de microsphère en ajoutant tout le flacon **D** de tampon de reconstitution des billes au flacon **A**. Attendre 5 minutes et vortexer.
- Durée de conservation après reprise : 2 mois entre +2°C et +8°C.

2. Préparation des échantillons et des contrôles

- Diluer les échantillons et les contrôles au 1/201 dans le tampon de dilution (**B1**).
Exemple : 10µl d'échantillon dans 2000µl de tampon de dilution (B1).
- Agiter vigoureusement au vortex.**

3. Définition de la configuration du test

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

a. Prévoir systématiquement :

- ✗ 1 puits « blanc réactif »
- ✗ 1 puits pour le contrôle négatif
- ✗ 1 puits pour le contrôle positif
- ✗ 2 puits « calibrateur »

b. Détermination du nombre exact de puits nécessaires et de leur attribution

Les schémas qui suivent donnent 2 exemples de configuration selon le nombre de puits nécessaires et la disponibilité en puits vierges. Le sens du dépôt doit s'effectuer systématiquement par colonne sans intercaler de puits vides.

Une même plaque peut être utilisée au cours de différents essais si les puits non utilisés sont protégés par des films pour microplaque. Un même puits ne peut être réutilisé plusieurs fois.

Afin d'éviter toute erreur dans ce sens, il est conseillé d'identifier les puits déjà usagés (voir exemple 2 ci-dessous).

c. Programmation du protocole d'analyses au niveau du FIDIS™

☞ Se reporter au manuel d'utilisation FIDIS™ « Programmation d'un batch ou d'un Multibatch. ».

Exemple 1 :

- la plaque est totalement vierge : l'attribution des puits débute en A1.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Blanc | E4 | E12 | E20 | | | | | | | | |
| B | Ctrl- | E5 | E13 | E21 | | | | | | | | |
| C | Ctrl+ | E6 | E14 | E22 | | | | | | | | |
| D | Cal | E7 | E15 | E23 | | | | | | | | |
| E | Cal | E8 | E16 | E24 | | | | | | | | |
| F | E1 | E9 | E17 | E25 | | | | | | | | |
| G | E2 | E10 | E18 | | | | | | | | | |
| H | E3 | E11 | E19 | | | | | | | | | |

Exemple 2 :

- 16 puits ont déjà été utilisés : l'attribution des puits débute en A3.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|
| A | | | Blanc | E4 | E12 | E20 | E28 | E36 | E44 | E52 | | |
| B | | | Ctrl- | E5 | E13 | E21 | E29 | E37 | E45 | E53 | | |
| C | | | Ctrl+ | E6 | E14 | E22 | E30 | E38 | E46 | | | |
| D | | | Cal | E7 | E15 | E23 | E31 | E39 | E47 | | | |
| E | | | Cal | E8 | E16 | E24 | E32 | E40 | E48 | | | |
| F | | | E1 | E9 | E17 | E25 | E33 | E41 | E49 | | | |
| G | | | E2 | E10 | E18 | E26 | E34 | E42 | E50 | | | |
| H | | | E3 | E11 | E19 | E27 | E35 | E43 | E51 | | | |

MODE OPÉRATEUR

1. Distribution des microsphères

- Protéger les puits non utilisés avec des films plastiques (si nécessaire).
- Déposer 50µl de microsphères dans chaque puits, **après avoir préalablement agité le flacon vigoureusement au vortex pendant 20s.**

REMARQUE :

- ☑ Dans le cadre de l'utilisation de l'automate CARIS™, une sonication des microsphères de 5 minutes est préconisée.
- ☑ Dans le cadre de l'utilisation d'un automate de dilution/répartition, les étapes 1 et 2 doivent être inversées :
⇒ distribuer le sérum dilué puis les microsphères

2. Incubation des échantillons

- Déposer 100µl de tampon de dilution (**B1**) pour le blanc réactif.
- Déposer 100µl de contrôles dilués, de calibrateur prêt à l'emploi et d'échantillons dilués.
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante sans agitation en recouvrant la plaque et en évitant de la laisser sous la lumière directe.

3. Lavage 1

Laver la plaque en utilisant l'unité de filtration par 2 cycles successifs en tampon de lavage (C1) :

- a. Retirer le couvercle de la microplaque et la positionner sur l'unité de filtration.
(vérifier que le robinet « casse vide » est en position fermée).
- b. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- c. Distribuer 300µl de tampon de lavage (C1).
- d. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- e. Distribuer 300µl de tampon de lavage (C1).
- f. Déclencher la pompe.
Après aspiration totale du liquide, compter 5 secondes supplémentaires, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- g. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base 10 fois sur du papier absorbant.
- h. Repositionner la plaque sur le laveur et filtrer à nouveau 5 secondes. Arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
- i. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base sur un papier absorbant.
- j. Placer ensuite la microplaque sur une surface totalement sèche avant de distribuer le conjugué

4. Incubation du conjugué

- Déposer 100µl de conjugué
- Laisser incubé 30 minutes à température ambiante sans agitation, en recouvrant la plaque et en évitant de la placer sous la lumière directe. Le temps d'incubation débute après que le conjugué ait été ajouté à tous les puits. Si ce temps n'est pas respecté, les résultats pourront être erronés.

Remarque : le conjugué est sensible à la lumière
⇒ Refermer le flacon après utilisation.

5. Lavage 2

Laver la plaque en utilisant l'unité de filtration par 1 cycle en tampon de dilution (B1) :

Utiliser de préférence deux réservoirs à réactifs distincts pour les lavages 1 et 2.

Ou bien nettoyer et sécher correctement le réservoir entre les deux lavages afin de ne pas mélanger les deux tampons B1 et C1.

- a. Retirer le couvercle de la microplaque et la positionner sur l'unité de filtration. (vérifier que le robinet « casse vide » est en position fermée).
- b. Déclencher la pompe.
Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide par ouverture du robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».

- c. Distribuer 100µl de tampon de dilution (B1).
- d. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- e. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base sur un papier absorbant.
- f. Distribuer 100µl de tampon de dilution (B1) et procéder à l'analyse de la microplaque.

En cas de lecture différée, la plaque devra être analysée **dans l'heure qui suit l'ajout de la solution (B1)**. Durant cette période, la plaque doit être conservée à température ambiante et protégée de la lumière directe.

6. Analyse

☞ L'effectuer conformément au manuel d'utilisation **FIDIS™** et **MLX BOOSTER™**.

CRITÈRES DE VALIDATION DES RÉSULTATS

Le calibrateur, les contrôles positif et négatif doivent être testés dans chaque série d'essai pour s'assurer que tous les réactifs et procédures ont été exécutés correctement.

Afin de valider les résultats, tous les critères énumérés ci-dessous doivent être rencontrés. En cas de non-conformité d'un de ces critères, le test devra être considéré comme non valide et l'analyse devra être refaite.

- a. La valeur du contrôle positif doit être comprise dans les limites de celles indiquées sur les étiquettes des flacons correspondants.
- b. La valeur du contrôle négatif doit être inférieure à 30 UA/ml ou 30 UI/ml.

La solution de microspheres contient des billes témoins permettant de vérifier la présence de sérum dans les puits, ainsi que le bon déroulement du test. Un puits présentant un signal-réponse non conforme sera invalidé par le logiciel MLX BOOSTER™.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

| | | | |
|---|------------|-----------------------|------------|
| Unités arbitraires (UA/ml) Excepté pour le dsDNA | < 30 UA/ml | 30 - 40 UA/ml | > 40 UA/ml |
| Interprétation | Négatif | Limite ^(*) | Positif |

| | | | |
|---|------------|-----------------------|------------|
| Unités internationales (UI/ml) pour le dsDNA | < 30 UI/ml | 30 - 40 UI/ml | > 40 UI/ml |
| Interprétation | Négatif | Limite ^(*) | Positif |

(*) Les résultats limites doivent être contrôlés sur un second prélèvement et interprétés en fonction d'examens complémentaires et du contexte clinique.

Chaque laboratoire doit établir et conserver ses propres valeurs de plage (normale) de référence, en fonction de la population de patients et d'autres facteurs locaux.

CALCUL DES RÉSULTATS

Les résultats sont automatiquement calculés par le logiciel MLX-BOOSTER™ et peuvent être imprimés pour chaque analyse.

LIMITES

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

Les sérums de patients immunodéprimés donneront un résultat non valide.

CONTRÔLE DE QUALITE

Il est conseillé d'utiliser des contrôles internes ou externes pour les différentes spécificités. Les contrôles multiparamétriques Immunotrol I, IV et V (bmd, réf.: HM036, HM051 et HM052) renferment des anticorps humains dirigés contre les spécificités recherchées. Ils sont à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

SENSIBILITÉ, SPÉCIFICITÉ ET CONCORDANCE PAR RAPPORT AUX AUTRES MÉTHODES

FIDIS™ Connective 10 a été comparé :

- ⇒ A une méthode ELISA : pour la détection des anticorps anti-SS-A 60kDa, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, dsDNA et TRIM21.
- ⇒ A une méthode Dot-Blot pour la détection des anticorps anti-centromère et anti-ribosome.

Méthodes de confirmation en cas de résultats discordants :

- ⇒ Méthode Dot-Blot pour les anticorps anti-SS-A 60 kDa, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, dsDNA et TRIM 21.
- ⇒ Immunofluorescence sur cellules HEp2000™ pour les anticorps anti-centromère.
- ⇒ Immunofluorescence sur triple substrat pour les anticorps anti-ribosome.

L'étude a porté sur 209 échantillons :

- ⇒ 112 échantillons associés à la présence de maladies systémiques autoimmunes
- ⇒ 48 échantillons provenant d'individus sains
- ⇒ 49 échantillons présentant des marqueurs biologiques susceptibles de provoquer des interférences (cryoglobulinémie, hypergammaglobulinémie, immunoglobulines monoclonales IgG et IgM, complément, facteur rhumatoïde, plasma, échantillons hémolysés, troubles).

Résultats

| Spécificité antigénique | Nbre de résultats positifs FIDIS™/ELISA ou DOT* | Sensibilité relative (%) | Spécificité relative (%) | Concordance (%) |
|-------------------------|---|--------------------------|--------------------------|-----------------|
| dsDNA | 40/42 | 95.5 | 100 | 99 |
| SS-A 60 kDa | 58/58 | 100 | 100 | 100 |
| TRIM21 | 50/51 | 98.1 | 100 | 99.5 |
| SS-B | 21/20 | 95.2 | 99 | 98.6 |
| Sm | 10/11 | 91.7 | 100 | 99.5 |
| Sm/RNP | 22/21 | 100 | 99.5 | 99.5 |
| Scl-70 | 9/9 | 100 | 100 | 100 |
| Jo-1 | 12/12 | 100 | 100 | 100 |
| Centromère | 9/9* | 100 | 100 | 100 |
| Ribosome | 5/5* | 100 | 100 | 100 |

Analyse des résultats discordants (8/209)

| Spécificité antigénique | Résultat FIDIS™ | Résultat ELISA | Résultat Dot-Blot ou INNO-LIA* | Spécificités associées |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| dsDNA | négatif | positif | négatif | SS-A 60kDa |
| dsDNA | négatif | faiblement positif | négatif | SS-A 60kDa TRIM21 |
| TRIM21 | négatif | faiblement positif | positif | aucune |
| SS-B | négatif | faiblement positif | positif | TRIM21 |
| Spécificité antigénique | Résultat FIDIS™ | Résultat ELISA | Résultat Dot-Blot ou INNO-LIA* | Spécificités associées |
| SS-B | faiblement positif | négatif | positif | SS-A 60kDa |
| SS-B | positif | limite | négatif | SS-A 60kDa TRIM21 dsDNA |
| Sm | négatif | faiblement positif | positif | Sm/RNP, SS-A 60kDa, dsDNA |
| Sm/RNP | positif | négatif | positif | SSA- 60kDa, dsDNA |

Ces 8 résultats correspondent à des valeurs en limite de positivité, ce qui tend à engendrer des discordances qui restent négligeables.

⇒ 4/8 résultats FIDIS sont confirmés par Dot-Blot.

Mode de détermination du seuil de positivité

Estimé à partir des 97 échantillons issus des populations « individus sains » et « interférences biologiques » et par rapport au standard Wo/80 pour la spécificité dsDNA.

Les seuils de positivité (40UA/ml ou 40UI/ml) correspondent au 100^{ème} percentile de la distribution des valeurs pour l'ensemble des 10 spécificités.

Les seuils de négativité (30UA/ml ou 30UI/ml) correspondent au 96^{ème} percentile pour l'ensemble des 10 spécificités.

Entre ces 2 seuils, les échantillons sont considérés limites.

Fidélité du test

| Spécificité antigénique | Intra-essai (10 tests dans le même essai) | | Inter-essais (5 tests dans 5 essais différents) | |
|-------------------------|--|--------|--|--------|
| | Valeur moyenne | CV (%) | Valeur moyenne | CV (%) |
| dsDNA | 150 | 3.8 | 61 | 5.0 |
| SS-A 60 kDa | 136 | 6.2 | 36 | 3.6 |
| SS-A 52 kDa | 171 | 6.1 | 55 | 4.2 |
| SS-B | 89 | 5.2 | 160 | 3.1 |
| Sm | 78 | 6.0 | 67 | 6.7 |
| Sm/RNP | 124 | 4.3 | 83 | 6.3 |
| Sci-70 | 185 | 3.5 | 123 | 3.9 |
| Jo-1 | 135 | 6.6 | 80 | 4.4 |
| Centromère | 283 | 4.5 | 167 | 2.8 |
| Ribosome | 68 | 2.2 | 120 | 3.0 |

BIBLIOGRAPHIE

SUSAN S. COPLLE, THOMAS B. MARTINS, C. MASTERSON, E. JOLY, HARRY R. HILL

Comparison of Three Multiplex Immunoassays for Detection of Antibodies to Extractable Nuclear Antigen Using Clinically Defined Sera.

Ann. N.Y Acad. Sci. 1109: 464-472 (2007).

BULIARD A, FORTENFANT F, GHILLANI-DALBIN P, MUSSET L, OKSMAN F, OLSSON N.O.

Related Articles, Links [Analysis of nine autoantibodies associated with systemic autoimmune diseases using the Luminex technology. Results of a multicenter study].

Ann Biol Clin (Paris), 2005; Jan-Feb, 63 (1): 51-8.

ROUQUETTE Anne-Marie, DESGRUELLES Chantal, LAROCHE Pascale

Evaluation of the new multiplexed immunoassay, FIDIS, for simultaneous quantitative determination of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. Hematology Laboratory, Tenon Hospital, 75020 Paris, France

Am J Clin Pathol., 2003; 120 (5): 676-81.

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.

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.

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.

SPENCER GREEN G. et al.

Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Sci70 antibodies.

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

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 Rothschild - 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.

KEECH CL et al.

SS-B (La) autoantibodies. Autoantibodies. Peter JB and Shoenfeld Y, editors.

Ed Elsevier 1996, 789-797.

MEENK RJ et al.

dsDNA autoantibodies.

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

HOMBURGER H.A.

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

ROUSSEL B. et al.

Analyse d'une technique dot-blot pour la détection de trois autoanticorps (anti-JO1, anti-M2 et anti-ribosomes). Comparaison avec les techniques de références.

Ann. Biol. Clin., 1995, 53, 487-490.

THE LS et al.

Antiribosomal P protein antibodies in systemic lupus erythematosus.

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

RAHMAN MA et al.

Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. Curr Opin Rheumatol 1994, (6), 468-473

D. LAKOMYA, C. SPLINGARTB, G. RENIERB, N-O OLSSONA

Intérêt clinique des anticorps anti-TRIM 21 (SS-A/Ro52 kDa) ?

REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - JUILLET/AOUT 2008 - N°404 BIS

KEEBLE AH, KHAN Z, FORSTER A, JAMES LC.

TRIM21 is an IgG receptor that is structurally, thermodynamically, and kinetically conserved.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr 22;105(16):6045-50. Epub 2008 Apr 17.

SCHULTE-PELKUM J, FRITZLER M, MAHLER M













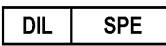

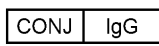
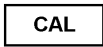
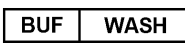
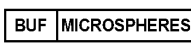



Latest update on the RO/SS-A autoantibody system.

Autoimmun Rev. 2009 Feb 11.

SCHÉMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

| | QUANTITÉ À DISTRIBUER | RÉACTIFS | CONDITIONS D'INCUBATIONS |
|--|--|---|---------------------------------|
| Déposer 50µl de microsphères dans chaque puits | | | |
| Incubation des échantillons | 100µl | Tampon de dilution (B1): blanc réactif | 30 min. Température ambiante |
| | 100µl | Contrôle négatif dilué | |
| | 100µl | Contrôle positif dilué | |
| | 100µl | Calibrateur (en double) | |
| | 100µl | Échantillons dilués | |
| Lavage 1 | Laver 2 fois au tampon de lavage (C1) (300µl/puits) | | |
| Incubation du conjugué | 100µl | Anti-IgG Prêt à l'emploi | 30 min Température ambiante |
| Lavage 2 | Laver 1 fois avec du tampon de dilution (B1) (100µl/puits) | | |
| Lecture | Ajouter 100µl/puits de tampon de dilution (B1) et analyser par insertion de la plaque dans le cytomètre de flux. <i>En cas de lecture différée, la plaque devra être analysée dans l'heure qui suit l'ajout de la solution (B1). Durant cette période, la plaque doit être conservée à température ambiante et protégée de la lumière directe.</i> | | |

LEGENDE DES SYMBOLES

| | | | | | |
|---|------------------------------|---|---|---|--|
|  | Risque Biologique |  | Conservé à |  | Numéro de catalogue |
|  | Lire le manuel d'utilisation |  | Pour le diagnostic in vitro uniquement |  | Numéro de lot |
|  | Nombre de tests |  | A utiliser avant |  | Déclaration de conformité CE |
|  | Microplaque |  | Contrôle négatif |  | Microspheres |
|  | Diluant échantillon |  | Contrôle positif |  | Conjugué IgG |
|  | Calibrateur |  | Tampon de lavage |  | Tampon de reconstitution des microsphères |
|  | Test FIDIS |  | Contient de l'azide de sodium |  | A reconstituer |

BioMédical Diagnostics SA

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

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

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



FIDIS™ Connective 10

REF **MX 006**



INTENDED USE

The **FIDIS™ Connective 10** kit is a semi-quantitative homogeneous fluorescent-based microparticles immunoassay using flow cytometry readings. It is designed for the simultaneous detection of 10 autoantibodies specificities: **double stranded DNA (dsDNA), SS-A (60 kDa), TRIM21** (*previously named **SS-A 52 kDa**), **SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, ribosomes and centromere**.

SUMMARY AND EXPLANATION

Connective diseases are systemic auto-immune diseases which are, 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 signs, will allow the identification of the specific connective disease. The titer of some autoantibodies, in particular for anti-dsDNA, provides vital information on progression of the disease and for monitoring treatment.

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 (SS-A 60kDa, TRIM21) 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). Anti-SS-A are also found in mothers who are carrying a baby with neonatal lupus syndrome including heart block.

Anti-RNP antibodies

Found primarily in Mixed Connective Tissue Disease or Sharp's Syndrome, for which they are the biological marker. They are also observed in SLE.

Antibodies specific to a single connective tissue disease

Anti-dsDNA antibodies are the most frequently detected and the most specific serological marker for SLE.

Anti-Sm antibodies characterize severe forms of SLE.

Anti-ribosomal antibodies are strongly associated with central neurological abnormalities in Lupus.

Anti-Scl-70 antibodies are specific for diffuse Scleroderma.

Anti-Jo-1 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.

ASSAY PRINCIPLE

FIDIS™ Connective 10 kits are based on the use of distinct uniform size color-coded microspheres and a benchtop flow cytometer interfaced to digital signal processing hardware and software. A red diode laser beam in the flow cytometer classifies each set of microspheres on the basis of its unique fluorescence intensity (red to orange) thus identifying which analyte is being tested. At the same time, a green laser beam illuminates the external second molecule fluorescence to quantify the reaction related to the specific analyte.

Each antigen, recombinant dsDNA, SS-B, TRIM21, CENP-B, Jo-1 and native purified Scl-70, SmRNP, Sm, ribosomal and SS-A 60 kDa, required for the assay is covalently coupled to an individual set of microspheres through its surface functional groups. The different antigen coupled microspheres are mixed together, constituting the final microsphere reagent.

FIDIS™ Connective 10 kits allow the detection of 10 autoantibodies specificities: **anti-double stranded DNA (dsDNA), anti-SS-A (60 kDa), anti-TRIM21** (*previously named **SS-A 52 kDa**), **anti-SS-B, anti-Sm, anti-Sm/RNP, anti-Scl-70, anti-Jo-1, anti-ribosomes and anti-centromere**.

The test is performed in a 96 well microplate with a filtering membrane at the bottom of the wells.

- In the first step, the sample is distributed in each well containing the microspheres mixture. If this sample contains one or more of the suspected antibodies, this(ese) antibody(ies) bind to the corresponding antigen(s) on the various sets of microspheres.
- After incubation, a wash step using a filtration process removes the unbound antibodies.
- A phycoerythrin labeled **anti-human IgG conjugate** is then added that binds to the previously bound antibodies.
- A final wash step allows to stop the reaction.
- The reaction is then directly measured by the flow cytometer, which differentiates each set of microspheres according to its fluorescence color while simultaneously measuring the average fluorescence emitted by the conjugate.
- A calibration system allows the determination of the titer (AU/mL) of each sample by interpolation for each following antigenic specificity : SS-A 60 kDa, TRIM21, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, ribosomes and centromère and the titer (IU/mL) of each sample by interpolation for the following antigenic specificity: dsDNA. The **FIDIS™ Connective 10** kits can be used with a dispensing/diluting device, the **CARIS™ system**.

SPECIMEN 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.

REAGENTS SUPPLIED

| | |
|--|------------|
| 96 wells microplate with filtering membrane and lid. MP | 1 plate |
| Vial (A) of color-coded microsphere set of 10 sensitized by dsDNA, SS-A 60 kDa, TRIM21, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, ribosomes and centromere antigen(s). MICROSPHERES <u>Lyophilized</u> (to be reconstituted with the buffer named D) | sq 6mL |
| Vial (B1) of sample dilution buffer (white vial) <u>Ready to use</u> DIL SPE | 2 x 115mL |
| Vial of calibrator* <u>Ready to use</u> Each titer is printed on the vial label CAL | 1 x 1,5mL |
| Vial of positive control concentrated. This control has a standard reactivity, which provides evidence of the proper reagents activity and proper assay performance. <u>To be diluted</u> CONTROL + Expected values are printed on the vial label. | 1 x 250 µL |
| Vial of negative control concentrate <u>To be diluted</u> CONTROL - | 1 x 250µL |
| Vial of anti-human IgG coupled to phycoerythrin <u>Ready to use</u> CONJ IgG | 1 x 12mL |
| Vial (C1) of washing buffer (black vial) <u>Ready to use</u> BUF WASH | 1 x 100mL |
| Vial (D) of reconstitution buffer for the microsphere set <u>Ready to use</u> BUF MICROSPHERES | 1 x 6mL |

Calibrator titers* are expressed in arbitrary units per ml (AU/ml) except for dsDNA.

Calibrator titer for dsDNA (IU/ml) is standardized against the international reference: Wo/80 WHO.

ADDITIONAL MATERIAL – NOT SUPPLIED

- Precision pipettes capable of accurately delivering 5µL to 1000µL
- Multichannel Pipettes or dispensers capable of accurately delivering 40µL to 300µL or 5µL to 2 mL
- Vortex mixer

- Laboratory timer to monitor incubation steps
- Ultrasonic bath
- Absorbent towel
- Serological pipettes
- Microplate sealing films

STABILITY AND STORAGE

- Store reagents in their original packaging at +2°C to +8°C.
- Do not freeze reagents.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- After use, store all components immediately back at +2°C to +8°C.

CAUTION

- Reagents in solution 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.
- Avoid to use reagents if signs of contamination or other visible changes occur
- The **FIDIS™ Connective 10** kit has been developed according to CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC regarding classification, packaging and labelling of dangerous preparations.
- The **FIDIS™ Connective 10** kit has been optimized for use as described in this procedure. Do not substitute other manufacturer reagents. Dilution or alteration of these reagents may also alter the performance of the test. Follow thoroughly the test procedure to insure optimal performance.
- *Calibrators and controls are from human origin. The human sera used in the preparation of these products were tested and found non-reactive for antibodies to HIV-1, HIV-2, anti-HCV and Hepatitis B antigen. Because no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, handle as if capable of transmitting infectious diseases.*
- If all specificities are found in the same patient sample, it is advisable to control this sample by another method.

TEST SET-UP

FIDIS™ Washer

- ☞ Check the tubing connecting the pump to the stand and the manometer setting (wheel completely closed).

Using FIDIS™ Analyzer and MLX-BOOSTER Software

- ☞ See the User's Manual provided with the **FIDIS™ Instrument** for detailed instructions on running the equipment and for calculation. For additional information and/or trouble shooting problems, please contact bmd subsidiaries or distributors.

1. Start the run as described in the User's Manual.
NOTE: The FIDIS™ takes 30 minutes to warm up after being turned on. A new warm up is necessary after 4 hours of system inactivity.
2. Calibration and controls are described in the User's Manual. Calibration and controls should be routinely performed once per month and each time a new lot of Sheath fluid reagent is used in order to insure optimal instrument performance. Calibration should also be performed when the temperature is out of the determined range shown on the run batch screen.
3. Programming a batch or a multibatch of test protocol on the FIDIS™.
4. Load the microplate into the plate holder of the FIDIS™ as described in the User's Manual.
5. Analyze the results according to the User's Manual.
6. When finished for the day, perform the sanitizing and soak operations, prior to turning the Analyzer off according to the shutting down procedure described in the User's Manual.

Reagents Preparation

☞ Remove the individual components from storage, allow them to warm up to **room temperature** (+18°C to +25°C), and mix them well.

1. Microsphere preparation

- Reconstitute the microsphere solution by adding the vial **D** of reconstitution buffer to the vial **A** of lyophilized microspheres. Wait 5 minutes and vortex.
- Stable 2 months at +2°C to +8°C, after reconstitution.

2. Preparation of samples and controls.

- Dilute the samples and controls at **1:201** in dilution buffer (**B1**).
Ex.: 10µL sample in 2000µL dilution buffer (B1).
- **Vortex vigorously.**

3. Assay configuration

Use the work-sheet included in the kit to identify the location of the samples.

a. When setting up the test, systematically take into account the following well requirements: ⇒ See examples below

- ✗ 1 "reagent-blank" well
- ✗ 1 well for negative control
- ✗ 1 well for positive control
- ✗ 2 "calibrator" wells

b. Calculation of the correct number of wells necessary and their location.

In the following examples, 2 different configurations are described, according to the number of wells needed, and the availability of unused wells. The sample dispensing must be systematically carried out in a column. Do not leave empty wells.

The same microplate can be used for more than one serie of tests if unused wells are protected by

microplate sealing film. Any single well can only be used once.

To avoid any error in using a well more than once, identify the used wells with a marker (see example 2 below).

c. Programming of the test protocol on the FIDIS™

☞ Refer to the FIDIS™ user's manual: "Creating a batch or a multi-batch".

Example 1:

- The microplate is totally blank (no well has yet been used): Use A1 as the 1st well.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Blank | S4 | S12 | S20 | | | | | | | | |
| B | Ctrl- | S5 | S13 | S21 | | | | | | | | |
| C | Ctrl+ | S6 | S14 | S22 | | | | | | | | |
| D | Cal | S7 | S15 | S23 | | | | | | | | |
| E | Cal | S8 | S16 | S24 | | | | | | | | |
| F | S1 | S9 | S17 | S25 | | | | | | | | |
| G | S2 | S10 | S18 | | | | | | | | | |
| H | S3 | S11 | S19 | | | | | | | | | |

Example 2:

- 16 wells have already been used: Use A3 as the 1st well.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|
| A | | | Blank | S4 | S12 | S20 | S28 | S36 | S44 | S52 | | |
| B | | | Ctrl- | S5 | S13 | S21 | S29 | S37 | S45 | S53 | | |
| C | | | Ctrl+ | S6 | S14 | S22 | S30 | S38 | S46 | | | |
| D | | | Cal | S7 | S15 | S23 | S31 | S39 | S47 | | | |
| E | | | Cal | S8 | S16 | S24 | S32 | S40 | S48 | | | |
| F | | | S1 | S9 | S17 | S25 | S33 | S41 | S49 | | | |
| G | | | S2 | S10 | S18 | S26 | S34 | S42 | S50 | | | |
| H | | | S3 | S11 | S19 | S27 | S35 | S43 | S51 | | | |

ASSAY PROCEDURE

1. Microspheres dispensing

- Before to start the assay and if it is necessary, protect the unused wells with a microplate sealing film.
- **Vortex the microspheres reagent vigorously for 20s** and dispense 50µL in each well to be used.

PLEASE NOTE:

- ☛ If CARIS™ is used, the microspheres should be sonicated for 5 minutes.
- ☛ If a dispensing/diluting device is used (like CARIS™), the procedure steps 1 and 2 should be reversed:
⇒ dispense diluted sera in first and then, dispense microspheres

2. Addition and Incubation of the samples

- Dispense 100µL of sample dilution buffer (**B1**) for reagent blank.
- Dispense 100µL of prediluted controls, of ready to use calibrator and of prediluted samples.
- Cover the plate and incubate 30 minutes at room temperature, away from direct sunlight and without shaking.

3. Wash step 1

Wash the plate 2 times with washing buffer (C1) using filtration unit:

- Remove the microplate lid (verify if the vacuum break valve is closed) and place it on the washer.
- Start the pump. Stop it when the whole incubation liquid has been removed in totality and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- Dispense 300µL of washing buffer (C1) in all the used wells.
- Start the pump. Stop it when the whole buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- Dispense 300µL of washing buffer (C1) in all the used wells.
- Start the pump. Stop it after 5 additional seconds when all the buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by tapping vigorously the plate 10 times on an absorbent towel.
- Place again the microplate on the washer and start the pump for 5 seconds. Stop it and quickly open the vacuum break valve.
- Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by blotting vigorously the plate on an absorbent towel.
- Place the plate on a totally dry surface before starting the conjugate incubation.

4. Incubation of the conjugate

- Dispense 100µL of ready to use conjugate in each well used.
- Cover the plate and incubate 30 minutes at room temperature away from direct sunlight and without shaking. The incubation time starts after the conjugate has been added to all wells. If this timing is not followed, the results might be erroneous.

Note : the conjugate is photosensitive.
 ⇒ **After using, close the vial carefully.**

5. Wash step 2

Wash the plate using the filtration unit on 1 cycle with dilution buffer (B1).

Use two different reagent reservoirs for the 2 washing steps. Either clean and dry correctly the reservoir between both wash steps (avoid to mix both B1 and C1 buffers).

- Remove the microplate lid (verify that the vacuum break valve is closed) and place it on the washer.
- Start the pump. Stop it when the whole incubation liquid has been removed and open the vacuum break valve.
Close the vacuum break valve.

- Dispense 100µL of dilution buffer (B1) in all the used wells.
- Start the pump. Stop it when the whole buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by blotting the plate on an absorbent towel.
- Dispense 100µL of dilution buffer (B1) in all the used wells. Place the plate on a totally dry surface at room temperature.
The reading must be doing in the hour following adding the solution (B1). During this time, keep the plate at room temperature away from direct sunlight.

6. Reading of the test

☞ Follow the **MLX-BOOSTER™** and **FIDIS™** user's manual: Processing batches.

VALIDATION CRITERIA OF THE RESULTS

Calibrator, negative and positive controls have to be run with every batch of samples to ensure that all reagents and procedures performed properly.

In order to validate the results, all the criteria listed below must be met. Otherwise, the test is invalid and must be repeated.

- The positive controls should show a value within the limits printed on the corresponding vial labels.
- The negative controls should be less than 30 AU/mL or 30 IU/mL.

The microsphere set contains Internal standard beads allowing to verify the presence of serum in wells, as well as the good respect of the test procedure. Wells presenting a not corresponding fluorescent signal will be no valid with MLX BOOSTER™ software.

INTERPRETATION OF RESULTS

| | | | |
|--|------------|---------------|------------|
| Arbitrary Units (AU/ml) except for the dsDNA | < 30 AU/ml | 30 – 40 AU/ml | > 40 AU/ml |
| Interpretation | Negative | Borderline(*) | Positive |

| | | | |
|---|------------|---------------|------------|
| International Units (IU/ml) for the dsDNA | < 30 IU/ml | 30 – 40 IU/ml | > 40 IU/ml |
| Interpretation | Negative | Borderline(*) | Positive |

(*) *Borderline results should be controlled on a second sample and the interpretation of the results should be done in the frame of additional testing and taking into account the clinical status of the patient.*

Each laboratory should establish and maintain its own references (normal) range values, based on the patient population and other local factors.

CALCUL OF RESULTS

The results are automatically calculated by MLX-BOOSTER™ software and can be printed for each assay.

LIMITATION

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

The serums from Immunodeficient patients will give a no valid result.

QUALITY CONTROL

It is recommended to use internally and externally sourced control material for the different specificities. Immunotrol I, IV and V multiparametric controls (bmd, Cat. n°: HM036, HM051 and HM052) contain human auto-antibodies directed against researched specificities. To be assayed in the same manner as the unknown samples.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCES OF THE TEST

INDICATION OF THE DIAGNOSTIC VALUE IN COMPARISON WITH OTHER METHODS.

FIDIS™ Connective 10 kit has been compared to:

- ⇒ ELISA method for the detection of antibodies anti-SS-A 60 kDa, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 and dsDNA and anti-TRIM21.
- ⇒ Dot-Blot method for the detection of antibodies anti-centromere and anti-ribosome.

Confirmation methods for discrepant results:

- ⇒ Dot-Blot method for antibodies anti-SS-A 60 kDa, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, dsDNA and TRIM21.
- ⇒ Immunofluorescence on HEp2000™ for antibodies anti-centromere.
- ⇒ Immunofluorescence on triple substrate for antibodies anti-ribosome.

The study was performed on 209 samples:

- ⇒ 112 samples related to systemic autoimmune diseases
- ⇒ 48 samples from blood donors
- ⇒ 49 samples selected for their potential biological interferences (cryoglobulinemia, hypergammaglobulinemia, IgG and IgM monoclonal immunoglobulins, complement, rheumatoid factor, plasma, haemolysed and turbid samples).

Results

| Antigenic Specificity | Nber of positive results FIDIS™ / ELISA or DOT* | Relative sensitivity (%) | Relative specificity (%) | Accuracy (%) |
|-----------------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------|
| dsDNA | 40/42 | 95.5 | 100 | 99 |
| SS-A 60kDa | 58/58 | 100 | 100 | 100 |
| TRIM21 | 50/51 | 98.1 | 100 | 99.5 |
| SS-B | 21/20 | 95.2 | 99 | 98.6 |
| Sm | 10/11 | 91.7 | 100 | 99.5 |
| Sm/RNP | 22/21 | 100 | 99.5 | 99.5 |
| Scl-70 | 9/9 | 100 | 100 | 100 |
| Jo-1 | 12/12 | 100 | 100 | 100 |
| Centromere | 9/9* | 100 | 100 | 100 |
| Ribosome | 5/5* | 100 | 100 | 100 |

Discrepant results analysis (8/209)

| Antigenic specificity | FIDIS™ Results | ELISA Results | Dot-Blot result | Associated specificities |
|-----------------------|----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| dsDNA | negative | positive | negative | SSA 60 kDa |
| dsDNA | negative | Weakly positive | negative | SSA 60 kDa TRIM21 |
| TRIM21 | negative | Weakly positive | positive | none |
| SS-B | negative | Weakly positive | positive | SSA 52 kDa |

| Antigenic specificity | FIDIS™ Results | ELISA Results | Dot-Blot result | Associated specificities |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| SS-B | Weakly positive | negative | positive | SS-A 60kDa |
| SS-B | positive | borderline | negative | SS-A 60kDa TRIM21 dsDNA |
| Sm | negative | Weakly positive | positive | Sm/RNP, SS-A 60kDa, dsDNA |
| Sm/RNP | positive | negative | positive | SS-A 60kDa, dsDNA |

All these 8 results are in limit of positivity, which can lead to no significant discrepancies.

⇒ 4/8 FIDIS results were confirmed by Dot-Blot.

Method for determining threshold values

Estimated on the 97 samples from « blood donors » and « biological interferences » populations and according standard Wo/80 for dsDNA specificity.

The positive thresholds (40AU/ml or 40IU/ml) correspond to the 100th percentile of the values distribution for all the 10 specificities.

The negative thresholds (30AU/ml or 30IU/ml) correspond to the 96th percentile for all the 10 specificities.

Between these two thresholds, samples are considered borderline.

REPRODUCIBILITY / PRECISION

| Antigenic Specificity | Within-run (10 tests in the same run) | | Between-run (5 tests in 5 different runs) | |
|-----------------------|--|--------|--|--------|
| | Mean value | CV (%) | Mean value | CV (%) |
| dsDNA | 150 | 3.8 | 61 | 5.0 |
| SS-A 60kDa | 136 | 6.2 | 36 | 3.6 |
| TRIM21 | 171 | 6.1 | 55 | 4.2 |
| SS-B | 89 | 5.2 | 160 | 3.1 |
| Sm | 78 | 6.0 | 67 | 6.7 |
| Sm/RNP | 124 | 4.3 | 83 | 6.3 |
| Scl-70 | 185 | 3.5 | 123 | 3.9 |
| Jo-1 | 135 | 6.6 | 80 | 4.4 |
| Centromere | 283 | 4.5 | 167 | 2.8 |
| Ribosome | 68 | 2.2 | 120 | 3.0 |

BIBLIOGRAPHY

SUSAN S. COPLLE, THOMAS B. MARTINS, C. MASTERSON, E. JOLY, HARRY R. HILL

Comparison of Three Multiplex Immunoassays for Detection of Antibodies to Extractable Nuclear Antigen Using Clinically Defined Sera.
Ann. N.Y Acad. Sci. 1109: 464-472 (2007).

BULIARD A, FORTENFANT F, GHILLANI-DALBIN P, MUSSET L, OKSMAN F, OLSSON N.O.

Related Articles, Links [Analysis of nine autoantibodies associated with systemic autoimmune diseases using the Luminex technology. Results of a multicenter study].
Ann Biol Clin (Paris), 2005; Jan-Feb, 63 (1): 51-8.

ROUQUETTE Anne-Marie, DESGRUELLES Chantal, LAROCHE Pascale

Evaluation of the new multiplexed immunoassay, FIDIS, for simultaneous quantitative determination of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. Hematology Laboratory, Tenon Hospital, 75020 Paris, France
Am J Clin Pathol., 2003; 120 (5): 676-81.

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.

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.

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.

SPENCER GREEN G. et al.

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

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 Rothschild - 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.

KEECH CL et al.

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

MEENK RJ et al.

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

HOMBURGER H.A.

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

ROUSSEL B. et al.

Analyse d'une technique dot-blot pour la détection de trois autoanticorps (anti-JO1, anti-M2 et anti-ribosomes). Comparaison avec les techniques de références.
Ann. Biol. Clin., 1995, 53, 487-490.

THE LS et al.

Antiribosomal P protein antibodies in systemic lupus erythematosus.
Arthritis Rheum. 1994, (37), 307-315.

RAHMAN MA et al.

Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. Curr Opin Rheumatol 1994, (6), 468-473

D. LAKOMYA, C. SPLINGARTB, G. RENIERB, N-O OLSSONA

Intérêt clinique des anticorps anti-TRIM 21 (SS-A/Ro52 kDa) ?
REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - JUILLET/AOUT 2008 - N°404 BIS

KEEBLE AH, KHAN Z, FORSTER A, JAMES LC.

TRIM21 is an IgG receptor that is structurally, thermodynamically, and kinetically conserved.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr 22;105(16):6045-50. Epub 2008 Apr 17.













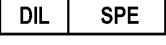

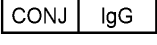

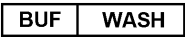
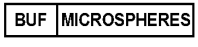

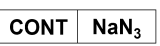

SCHULTE-PELKUM J, FRITZLER M, MAHLER M

Latest update on the RO/SS-A autoantibody system.
Autoimmun Rev. 2009 Feb 11.

SUMMARY OF THE TEST PROCEDURE

| | VOLUME TO BE DISTRIBUTED | REAGENTS | INCUBATION CONDITIONS |
|---|--|---|-----------------------------|
| Dispense 50µL of microspheres reagent in each well to be used | | | |
| Incubation of the samples | 100µL | Dilution buffer (B1) : Reagent blank | 30 min. Room temperature |
| | 100µL | Diluted negative control | |
| | 100µL | Diluted positive control | |
| | 100µL | Calibrator (in duplicate) | |
| | 100µL | Diluted samples | |
| Washing 1 | Wash twice in washing buffer (C1) (300µL/well) | | |
| Incubation of the conjugate | 100µL | Ready to use Anti-IgG conjugate | 30 min Room temperature |
| Washing 2 | Wash 1 time in Dilution buffer (B1) (100µL/well) | | |
| Reading | <p>Add 100µL/well of Dilution buffer (B1) and proceed immediately with the reading in FIDIS™ Instrument</p> <p>The reading must be doing in the hour following adding the solution (B1). During this time, keep the plate at room temperature away from direct sunlight.</p> | | |

SYMBOLS USED

| | | | | | |
|---|---------------------------|---|-------------------------|---|-----------------------------------|
|  | Biological risk |  | Temperature limitation |  | Catalog Number |
|  | Read instructions for use |  | In Vitro Diagnostic Use |  | Lot Number |
|  | Number of tests |  | Use by |  | EC Declaration of Conformity |
|  | Microplate |  | Negative control |  | Microspheres |
|  | Specimen diluent |  | Positive control |  | IgG Conjugate |
|  | Calibrator |  | Wash Buffer |  | Microsphere reconstitution buffer |
|  | FIDIS test |  | Contains sodium azide |  | Reconstitute with |

BioMédical Diagnostics SA

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

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

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

