



## Dépistage anti-antigènes nucléaires solubles (ENA) ELISA

IVD

### ENCART DU PRODUIT

REF 37797 Test Anti-ENA Screen 96 Tests

#### USAGE PREVU

Dosage immunoenzymatique de type ELISA destiné à la détection et la quantification des anticorps IgG des antigènes nucléaires solubles (ENA) [RNP, Sm, SS-A (Ro), ou S-B (La)] dans le sérum humain de patients chez qui l'on soupçonne des collagénoses vasculaires.

#### RESUME ET EXPLICATION

Les antigènes nucléaires solubles (ENA) sont des complexes ribonucléoprotéiques solubles (snurps). Les auto-anticorps dirigés contre divers antigènes nucléaires solubles (ENA) se sont montrés utiles dans le diagnostic et le contrôle de diverses maladies du tissu systémique connectif. Les anticorps anti-Sm sont spécifiques de la maladie et représentent donc un marqueur pour le lupus érythémateux systémique (SLE). Les anticorps anti-Sm se manifestent chez approximativement 30-40% des patients atteints de SLE. Ils sont rares dans les autres maladies du tissu conjonctif systémique et, s'ils sont présents, ils indiquent des formes de chevauchement ou des patients qui n'ont pas encore répondu aux critères ARA (American Rheumatism Association) pour le SLE<sup>1-9</sup>. D'autres anticorps tels que ceux qui sont dirigés contre SS A (Ro), SS-B (La) et RNP ne sont pas spécifiques de la maladie. Les anticorps anti-RNP (ribonucléoprotéine) se manifestent chez 35-45% des patients atteints de SLE et chez 95% des patients atteints de connectivité mixte (MCTD). Parfois ils apparaissent également dans la *sclérodémie, la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux induit par des médicaments*<sup>1-6</sup>. Les patients présentant des anticorps anti-RNP présentent une incidence plus basse d'affections rénales par rapport aux patients avec des anticorps anti-Sm. Les anticorps anti-SS A (Ro) et SS-B (La) se manifestent respectivement chez approximativement 30-40% et 10-15% des patients atteints de SLE et 60-70% et 40-60% des patients atteints du syndrome de Sjögren. Les anticorps anti-SS-B (La) se manifestent plus fréquemment en association avec des anticorps anti-SS A (Ro). Les anticorps anti-SS A (Ro) se manifestent également chez 60% des patients avec *lupus érythémateux subaigu (LE)*, dans presque tous cas de lupus érythémateux (LE) néo-natal et chez les deux-tiers des malades SLE avec déficit en C2<sup>10-13</sup>. Les anticorps anti-Scl-70 sont un marqueur sérologique spécifique pour la sclérose systémique. Des fréquences variables d'anticorps Scl-70 ont été signalées. Dans les premières études, cet anticorps a été détecté chez approximativement 20% de malades avec sclérodémie mais des études plus récentes mentionnent une fréquence de 75% chez les patients avec sclérodémie diffuse et 44% chez les patients avec acrosclérose<sup>5</sup>.

Des anticorps spécifiques de la myosite sont présents chez 25-40% des patients adultes souffrant de myopathies inflammatoires idiopathiques et sont principalement spécifiques pour les t-ARN synthétases cytoplasmiques<sup>12</sup>. Sur les cinq anticorps anti-synthétases décrits, les anticorps anti-histidyl-tRNA synthétase (Jo-1) chez les patients souffrant de myosite sont associés avec des caractéristiques cliniques telles que maladie du poumon interstitielle, fibrose pulmonaire, phénomène de Raynaud, fièvre et polyarthrite symétrique non-érosive des petites articulations.

Les anticorps contre les antigènes nucléaires solubles peuvent être détectés par plusieurs méthodes. En raison des difficultés pour obtenir des antigènes ENA hautement purifiés, les méthodes de l'immunodiffusion sur gel sont traditionnellement utilisées. Cependant, la méthode ELISA présente de nombreux avantages par rapport à l'immunodiffusion sur gel : une plus grande sensibilité<sup>14</sup>, des délais de test limités, aucune subjectivité dans la lecture des résultats, une quantification sans titrage du sérum et la possibilité de procéder à une automatisation. Le dépistage Menarini™ ENA Screen ELISA a recours à des antigènes hautement purifiés pour détecter les anticorps ENA.

#### PRINCIPE DE LA METHODE

Le test est réalisé sous la forme d'une méthode immuno-enzymatique (solid phase enzyme labeled immunosorbent assay - ELISA). Des microplaques à puits sont enduites d'antigènes purifiés Sm, RNP, SS-A (Ro) ou SS-B



(La), Scl-70 et Jo-1, suivi par un blocage des sites inaltérés pour réduire l'agglutination non-spécifique. Les régulateurs, les étalons et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits enduits d'antigène qui permettent aux anticorps spécifiques anti-antigènes nucléaires solubles (ENA) qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques. Les anticorps agglutinés sont détectés par un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain ajouté aux puits. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage. La phosphatase alcaline et son substrat spécifique (pNPP) sont ensuite ajoutés aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion du substrat pNPP. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA (EU)/ml et les résultats sont rapportés sous la forme de positif, cas limite ou négatif.

## REACTIFS

### Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant l'usage.

Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

### Précautions

Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux<sup>15</sup>.

**AVERTISSEMENT** – L'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources, si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue de A. Menarini Diagnostics S.r.l.. Il faut respecter de bonnes pratiques de laboratoire pour limiter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs au moment de la manipulation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

### Matériel fourni

Menarini™ Test Anti-ENA Screen **REF** 37797

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.

12 x 8 **MICROPLATE** **ENA**

**Microplaques** avec micropuits individuels séparables enduits d'antigènes ENA.

1 x 1,5 ml **CALIBRATOR** **ENA** \*

**Étalon** prêt à l'emploi (*couvercle vert*). Sérum humain contenant des anticorps anti-ENA.

1 x 1,5 ml **CONTROL** + **ENA** \*

**Régulation Positive** prête à l'emploi (*couvercle rouge*). Sérum humain contenant des anticorps anti-ENA.

1 x 1,5 ml **CONTROL** - \*

**Régulation Négative** prête à l'emploi (*couvercle blanc*). Contient du sérum humain.


 1 x 12 ml **IgG-CONJ ALKPHOS** \*

**Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines.** Prêt à l'emploi. Code couleur rose.

 1 x 60 ml **DIL** \*

**Diluant de sérum** prêt à l'emploi. Codé en couleur bleue.

 1 x 12 ml **SUBSTRATE** \*

**Substrat d'enzyme** prêt à l'emploi. **Conserver à l'abri de la lumière.**

 1 x 12 ml **STOP**

**Solution d'arrêt** prête à l'emploi. Contient H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5M

 2 x **BUF WASH**

**Poudre Wash Buffer (solution de lavage).** Reconstituer dans un litre chacun.

\* Contient <0,1% NaN<sub>3</sub>

### Symboles utilisés sur les étiquettes:

**LOT** Numéro de lot

**REF** Numéro de référence catalogue

A utiliser avant

Température de conservation

Lire les instructions d'utilisation

**IVD** Pour usage diagnostique In vitro

Fabricant

Nombre de tests

### Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée ou le dispositif de lavage de microplaques automatique en mesure de dispenser 200 µl
- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.

### RECOLTE DES SPECIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum devraient être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou atteints de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.



## PROCEDURE

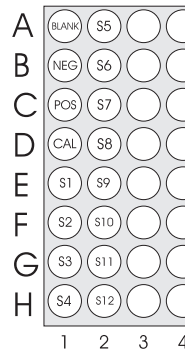
### Notes de procédure

- Avant de commencer l'essai, il faut lire avec soin la brochure qui accompagne le produit.
- Laisser les spécimens de sérum et les réactifs de test arriver à température ambiante avant d'entreprendre la procédure de test. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.
- Toutes les dilutions des échantillons des patients doivent être préparées avant de commencer l'essai.
- Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. Si le lavage est réalisé manuellement, il est fait de manière adéquate en dirigeant un flux puissant de solution de lavage avec un flacon-laveur à pointe large à travers toute la microplaque. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit avoir lieu au même taux et selon la même séquence.
- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.

### Méthode de test

**Etape 1** Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante.

**Etape 2** Étiqueter la feuille de protocole pour indiquer le placement de l'échantillon dans les puits. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.



**Etape 3** Préparer une dilution **1:101** de spécimens patient en pipétant **5µl** de sérum dans **0.5 ml** de diluant de sérum. **Bien mélanger.**

**Etape 4** Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer solidement les microplaques à puits dans le support fourni comme accessoire.

**Etape 5** Pipeter **100 µl** de étalon prêt à l'emploi, de régulateur positif et négatif et d'échantillons patients dans les puits appropriés, comme dans le schéma de l'échantillon ci-dessus.

**Note :** Inclure un puits qui contient **100 µl** de diluant de sérum à titre de réactif blanco. Mettre à zéro le lecteur ELISA sur le réactif blanco. L'absorption du réactif à blanc ne doit pas être supérieure à 0,3 quand elle est mesurée par rapport à l'air.

**Etape 6** Incuber pendant **30 minutes** ( $\pm 5$  min) à température ambiante.

**Etape 7** Laver **4x** avec de la solution de lavage. En cas de lavage manuel, remplir chaque puits avec de la solution de lavage reconstituée. Eliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque



- puits ou en aspirant le liquide de chaque puits. Pour absorber à la fin du dernier lavage, renverser les bandes et tapoter vigoureusement les puits sur les serviettes de papier absorbant. Dans le cas de dispositifs de lavage automatiques, programmer le dispositif de lavage en suivant les instructions du fabricant.
- Etape 8** Pipeter **100 µl** de conjugué dans les microplaques à puits.
- Etape 9** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 10** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 7.
- Etape 11** Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrage que pour le conjugué.
- Etape 12** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 13** Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puits en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de 1 heure après l'addition de la solution d'arrêt.
- Etape 14** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou a double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

### Contrôle de qualité

Les étalons, les régulateurs positif et négatif et un réactif blanco doivent être utilisés lors de chaque test pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif blanco doit être inférieure à 0,3. L'étalon doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le régulateur positif doit fournir des valeurs EU/ml dans la plage figurant sur le flacon. Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures devrait être prise en considération pour déterminer EU/ml

### RESULTATS

#### Calculs

#### DOSAGE QUALITATIF

**Abs. de l'échantillon d'essai**

----- X **EU/ml de l'étalon** = **EU/ml échantillon d'essai**

**Abs. de l'étalon**

Cette méthode de calcul doit être utilisée uniquement pour déterminer si un spécimen est négatif ou positif.

#### Etalon

L'étalon doit être inclus à chaque opération. Les échantillons patients qui contiennent des niveaux d'anticorps très élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux de l'étalon. Dans un tel cas, ces échantillons de sérum doivent être dilués davantage avec du diluant de sérum et retestés. Pour la détermination EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

#### Interprétation

Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

<b>Valeur anti-ENA EU</b>	<b>Interprétation</b>
<20 EU/ml	Négatif
20-25 EU/ml	Indéterminé (cas limite)
>25 EU/ml	Positif



## LIMITES DE LA PROCEDURE

Le test Menarini™ Anti-ENA Screen ELISA ne devrait pas être exécuté sur des échantillons grossièrement hémolysés, contaminés du point de vue microbien ou lipémiques. Cette méthode doit uniquement être utilisée pour le test d'échantillons de sérum humain. Il ne faut pas poser de diagnostic en se basant uniquement sur le test ELISA.

## VALEURS ATTENDUES

L'incidence des anticorps ENA dans plusieurs maladies du tissu conjonctif systémique est résumée dans le tableau suivant :

### Signification diagnostique des anticorps de différents antigènes nucléaires solubles

Isotype anticorps	Association maladie
Sm	SLE - 10-40%
RNP	SLE - 20-30%
	MCTD - 95-100%
SS-A (Ro)	SLE - 15-33%
	SCLE - 60%
	Lupus érythémateux néo-natal - 100%
	Syndrome de Sjögren - 40-70%
SS-B (La)	SLE - 10-15%
	SCLE - 25%
	Syndrome de Sjögren - 15-60%
<Jo-1	Polymyosite – 32%
	Chevauchement polymyosite
	Dermatomyosite - 20%
ScI-70	Sclérodermie - 20-40%
	Acrosclérose - 44%

SLE = Lupus érythémateux systémique

MCTD = connectivité mixte

SCLE = Lupus érythémateux cutané subaigu

Note : La fréquence de la spécificité de chaque anticorps dans une maladie représente une compilation de la littérature<sup>3</sup>. L'incidence varie selon la population des patients

## DONNEES DE RENDEMENT

Le test Menarini™ Anti-ENA Antibody Screen ELISA a été comparé avec l'ENA ImmunoBlot. Un total de 125 sérums d'un laboratoire clinique de référence ont été identifiés par immunodiffusion comme étant positifs ou négatifs pour les anticorps anti-RNP, anti-Sm, anti-SS A (Ro) ou anti SS-B (La), anti-ScI-70 et anti-Jo-1.

Ces sérums ont été testés d'après la procédure recommandée par le fabricant. Les résultats sont repris dans le tableau :

### Comparaison des méthodes ELISA pour la détection d'anticorps des antigènes nucléaires solubles (ENA)

		Menarini™ ENA Screen		
		Positif	Négatif	Négatif
Immunoblot	Positif	50	2	52
	Négatif	0	73	73
	Négatif	50	75	125

Accord : 98%

Sensibilité : 96%

Spécificité : 100


**Précision :**

Deux échantillons avec des concentrations connues d'ENA ont été analysés dans 10 mesures sur une période de deux semaines. Les coefficients de variation Intra - et inter- essai (CV) étaient les suivants :

	<b>inter-essai</b>	<b>intra-essai</b>
	<b>%CV</b>	<b>%CV</b>
	<b>IgG</b>	<b>IgG</b>
<b>Échantillon 1</b>	3.6	4.5
<b>Échantillon 2</b>	5.4	3.7

**Récupération :**

Des échantillons avec des concentrations connues anti-ENA ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon avec des quantités connues d'anti-ENA. Les niveaux anti-ENA des échantillons mélangés ont été déterminés et on a calculé le pourcentage de récupération à partir des valeurs obtenues. Les résultats sont les suivants :

	<b>Anti-ENA</b>	<b>Anti- ENA</b>	
	<b>Ab. conc. ajoutée</b>	<b>Ab. conc. obtenue</b>	<b>% Récupération</b>
	<b>(EU/ml)</b>	<b>(EU/ml)</b>	
<b>Échantillon 1</b>	85	81	95
<b>Échantillon 2</b>	34	37	107
<b>Échantillon 3</b>	51	57	112



**REFERENCES • BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA**

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33: 167-240, 1982.
2. Tan EM. Special antibodies for the study of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 25: 753-756, 1982.
3. Tan EM, Chan E, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear anti- bodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 47: 121-141, 1988.
4. Reichlin M. Current perspectives on serological reactions in SLE patients. *Clin Exp Immunol* 44: 1-10, 1981.
5. Reichlin M and Harley JB. Antibodies to extractable nuclear antigens: clinical significance. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 555-563, 1987.
6. Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity and the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1, Cruse JM and Lewis RE, Eds, Karger, Basel, 318-353, 1985.
7. McCarty GA. Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. *Medical Clinics of North America* 70: 237-261, 1986.
8. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 29: 457-460, 1986.
9. Williamson GG and Boyle JA. Antigenic relatedness of small ribonucleoprotein particles. *Biochem Biophys Acta* 798:149-155, 1984.
10. Clark G, Reichlin M and Tomasi TB. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 110:117-124, 1969.
11. Alspaugh MA and Maddison P. Resolution of the identity of certain antigen antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arth Rheum* 22: 796-798, 1979.
12. Targoff IN, Reichlin M. Measurement of antibody to Jo-1 by ELISA and comparison to enzyme inhibitory activity. *J Immunol* 138:2874-2882, 1987.
13. Jarzabek-Chozelska M et al. Scl-70 antibody - a specific marker of systemic sclerosis. *Br J Dermatol*; 115:393-401, 1986.
14. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, Brennan DM and Hough D. Antibodies to nRNP, Ro (SS-A) and La (SS-B) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. *Clin Exp Immunol* 62: 337- 245, 1985.
15. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, (HHS Pub No [CDC] 88-8395), 1988.





**A. Menarini Diagnostics S.r.l.**  
via Sette Santi 3  
50131 Firenze  
Italia

**EL**

Διανέμεται στην  
**ΕΛΛΑΔΑ** από την  
A. Menarini Diagnostics S.A.  
575, Vouliagmenis Ave.  
16451 Argypopolis  
Attiki

**AT**

**ÖSTERREICH**  
Vertrieb durch  
A. Menarini Ges.m.b.H  
Pottendorfer Straße, 25/27  
A - 1120 Wien

**BE**

**BELGIQUE**  
Distribué par  
A. Menarini Diagnostics  
Benelux S.A./N.V.  
Belgicastraat, 4  
1930 Zaventem

**PT**

**PORTUGAL**  
Distribuido por  
A. Menarini Diagnósticos, Lda  
Quinta da Fonte  
Edifício D.Manuel I, 2ºB  
2770-203 Paço de Arcos

**NL**

**NEDERLAND**  
Distributed by  
A. Menarini Diagnostics  
Benelux N.V.  
De Haak, 8  
5555 XK Valkenswaard

Date of issue: March 2007  
Data de publicação: Março de 2007  
Ausgabedatum: März 2007  
Date d'émission : Mars 2007  
Ημερομηνία έκδοσης: Μάρτιος 2007

Document No. PI4149 CEI M

