



Anticorps anti-Jo-1 ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 37799 Anticorps anti-rJo ELISA 96 Tests

USAGE PREVU

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA destiné à la détection et la semi-quantification des anticorps anti-Jo-1 dans le sérum humain.

RESUME ET EXPLICATION

La *polymyosite* et la *dermatomyosite* comprennent un groupe hétérogène de maladies musculaires acquises appelées myopathies inflammatoires idiopathiques. Elles sont caractérisées par une faiblesse musculaire proximale et souvent symétrique qui se développe relativement lentement. Les patients atteints de myopathies inflammatoires idiopathiques peuvent présenter des symptômes non-spécifiques tels que fatigue, arthralgie et myalgie que peuvent imiter d'autres affections et se traduisent par des retards considérables quand il s'agit de poser un diagnostic correct et d'entreprendre un traitement. Des auto-anticorps se manifestent chez 60-90% des malades atteints de myopathies inflammatoires idiopathiques et leur découverte se révèle utile pour distinguer ces myopathies d'autres formes de maladies musculaires.

Deux grands groupes d'auto-anticorps peuvent être détectés dans la myosite : les anticorps spécifiques de la myosite et les anticorps qui ne sont pas spécifiques mais associés¹⁻⁵.

Les anticorps spécifiques de la myosite sont présents chez 25-40% des patients adultes atteints de *myopathies inflammatoires idiopathiques*. Certaines concentrations d'anticorps, y compris celles des anti-t-RNP synthétases, correspondent à une activité de la maladie et se manifestent par une réaction cytoplasmique sur les cellules HEp-2 et sur différents substrats du tissu. Les anticorps anti-histidyl-tRNA (Jo-1) synthétase sont les plus communs. Les patients atteints de myosite et qui sont positifs pour les anticorps Jo-1 manifestent un tableau clinique semblable, en particulier maladie interstitielle pulmonaire, fibrose pulmonaire, phénomène de Raynaud, fièvre et polyarthrite non-érosive des petites articulations.

Les anticorps associés à la myosite y compris les U1-RNP, PM/ScI, Ku et SS-A(Ro) se manifestent non seulement dans la myosite mais aussi dans les autres affections du tissu conjonctif. Ces auto-anticorps peuvent être détectés par plusieurs méthodes, tel que diffusion sur gel, Western Blot ou ELISA.

PRINCIPES DE LA METHODE

Le test est réalisé sous la forme d'une méthode immuno-enzymatique (solid phase enzyme labeled immunosorbent assay - ELISA) Des micropuits sont enduits d'antigène purifié Jo-1. 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-Jo-1 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 en ajoutant un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain aux puits. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage. La phosphatase alcaline et son substrat (pNPP) sont ensuite ajoutés aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion de substrat du pNPP vers un produit de réaction coloré.

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 par millilitre (EU)/ml.

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. Quand il est entreposé à 2-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration de l'équipement. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée. Les microplaques sont destinées à être utilisées une fois seulement.

Précautions

Destiné à un usage diagnostique *in vitro*. 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 humains 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 matériaux¹³.

AVERTISSEMENT – L'azide de sodium (NaN₃) 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 d'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

Anticorps Menarini™ anti-rJo ELISA **REF** 37799

L'équipement contient des réactifs en suffisance pour procéder à 96 tests.

12 x 8	MICROPLATE Jo-1	Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A Jo-1 *	Etalon A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B Jo-1 *	Etalon B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C Jo-1 *	Etalon C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D Jo-1 *	Etalon D (<i>couvercle jaune</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- Jo-1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + Jo-1 *	Régulateur positif (<i>couvercle rouge</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- Jo-1.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Régulateur négatif (<i>couvercle blanc</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines . Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL *	Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.


 1 x 12 ml **SUBSTRATE** *

Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. **Protéger de la lumière.**

 1 x 12 ml **STOP**

Solution d'arrêt prête à l'emploi.

 2 x **BUF WASH**

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

* Contient <0.1% NaN₃

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 dispositif de lavage de microplaques automatique en mesure de dispenser 200µl
- 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 de test
- 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 doivent 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 le test, lire avec soin la brochure qui accompagne le produit.
- Conserver les spécimens de sérum et les réactifs de test 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.

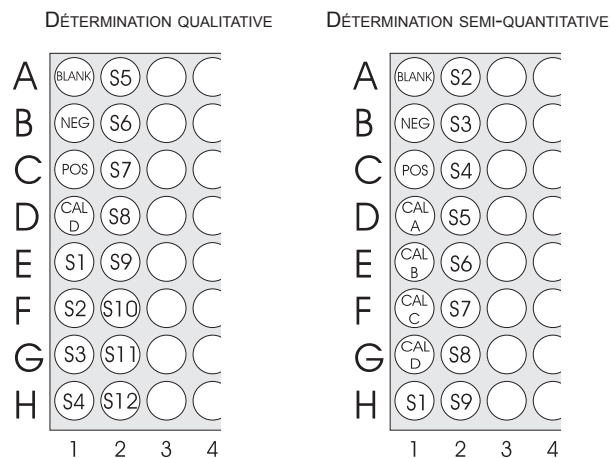
Méthode de test

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 Pour une détermination qualitative, utiliser seulement le Étalon Bas D prêt à l'emploi (flacon avec couvercle jaune).

ou Pour un **dosage semi-quantitatif**, utiliser les étalons A à D prêts à l'emploi comme montré dans le schéma d'échantillon figurant ci-dessous.



Etape 4 Préparer une dilution **1:101** de spécimen patient en pipetant **5µl** de sérum dans **0.5 ml** de diluant de sérum. **Bien mélanger.**

Etape 5 Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet de bourse et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer solidement les microplaques à puits dans le support fourni comme accessoire.

Etape 6 Pipeter **100 µl** de étalon prêt à l'emploi, de régulateur positif et négatif et d'échantillons patient dans les puits appropriés comme dans le schéma de l'échantillon ci-dessus.

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

Etape 7 Incuber pendant 30 minutes (± 5 min) à température ambiante.



- Etape 8** Laver **4x** avec de la solution de lavage. En cas de lavage manuel, remplir chaque puits avec de la solution de lavage reconstituée. Éliminer 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 9** Pipeter **100 µl** de conjugué dans les microplaques à puits.
- Etape 10** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 11** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 7.
- Etape 12** Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrage que pour le conjugué.
- Etape 13** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 14** 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 15** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif blanco programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

Des étalons, des régulateurs positif et négatif et un réactif blanco doivent être utilisés à 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 A doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures devrait être prise pour déterminer EU/ml. Quand on procède aux dosages qualitatifs, l'absorption de l'étalon D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs dans la plage figurant sur le flacon.

RESULTATS

Calculs

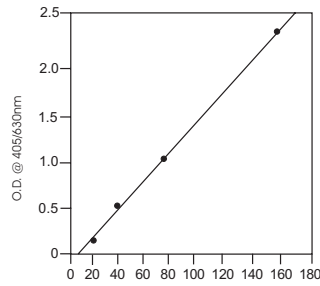
Les concentrations des échantillons patient peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

1. DOSAGE QUALITATIF

$$\frac{\text{Abs. de l'échantillon d'essai}}{\text{Abs. de l'étalon}} \times \text{EU/ml de l'étalon} = \text{EU/ml échantillon d'essai}$$

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption des étalons A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en EU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe optimale. Déterminer les concentrations des échantillons patient de la courbe par rapport à la valeur d'absorption correspondante.



Etalon

Les étalons prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patient qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux de l'étalon A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent en outre être dilués, de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe de l'étalon quand on refait le test. 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. Celles-ci peuvent varier en fonction de la population examinée.

anti-Jo-1 conc.	Interprétation
< 20 EU/ml	Négatif
20-25 EU/ml	Indéterminé (cas limite)
>25 EU/ml	Positif

LIMITES DE LA PROCEDURE

Les résultats obtenus à l'aide du test Menarini™ anti-Jo-1 servent seulement comme aide pour poser le diagnostic général et ne devraient pas être interprétés comme un diagnostic par eux-mêmes.

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol*; 1982, 33:167-240.
2. Tan EM. Special antibodies for the study of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum*; 1982, 25:753-756.
3. Tan EM, Chan E, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immun Immunopath*; 1988, 47:121-141.
4. Reichlin M. Current perspectives on serological reactions in SLE patients. *Clin Exp Immunol*; 1981, 44:1-10.
5. Reichlin M and Harley JB. Antibodies to extractable nuclear antigens: clinical significance. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Choreski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed; 1987, 555-563.
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; 1985, 318-353.
7. McCarty GA. Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. *Medical Clinics of North America*; 1986, 70:237-261.
8. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum*; 1986, 29:457-460.
9. Williamson GG and Boyle JA. Antigenic relatedness of small ribonucleoprotein particles. *Biochem Biophys Acta*; 1984, 798:149-155.
10. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol*; 1989, 44:93-151.
11. Jarzabek-Chozelska M et al. Scl-70 antibody - a specific marker of systemic sclerosis. *Br J Dermatol*; 1986, 115:393-401.
12. Kumar V, Beutner EH, Dabski K, Steger R and Koelle M. A standardized method of detecting antibodies to extractable nuclear antigens (RNP and Sm) by gel precipitation. *J Clin Lab Immunol*; 1984, 15:163-166.
13. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories Centers for Disease Control, National Institutes of Health; 1993, (HHS Pub. No{CDC} 93-8395).



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.
Belgicastaat, 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. PI4151 CEI M

