



## ELISA Profil ENA (Anti-Antigènes Nucléaires Extractibles)

IVD

### ENCART DU PRODUIT

REF 39519 ELISA Profil ENA

### USAGE PREVU

Test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) pour la détection des anticorps IgG aux antigènes nucléaires extractibles Sm/RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Scl-70 et Jo-1 dans le sérum de patients suspectés de désordres du tissu conjonctif.

### GENERALITES

Les antigènes nucléaires extractibles (ENA) sont des ribonucléoprotéines solubles (snurps) localisées dans les noyaux des cellules et le cytoplasme des cellules et des tissus. Les auto-anticorps dirigés contre différents ENA sont importants pour le diagnostic et le suivi de diverses maladies systémiques du tissu conjonctif. Par exemple, les anticorps Sm sont spécifiques pour la maladie du *lupus érythémateux disséminé* (LED). Les anticorps Sm apparaissent chez environ 30-40% des patients LED. Ils sont rares dans d'autres maladies systémiques du tissu conjonctif et s'ils sont présents, ils indiquent une pathologie associée au LED par d'autres désordres du tissu conjonctif ou les patients LED n'ont pas encore l'ensemble des critères ARA<sup>1-9</sup>. D'autres anticorps tels que ceux dirigés contre SS-A (Ro), SS-B (La) et RNP ne sont pas spécifiques de la maladie et peuvent être présents en cas de LED et d'autres désordres du tissu conjonctif. Les anticorps au RNP apparaissent chez 35-45% des patients LED et chez 95% des patients avec des *désordres variés du tissu conjonctif* (MCTD). Occasionnellement, on les retrouve également dans la *sclérodémie*, la *polyarthrite rhumatoïde* et les *lupus induits par les médicaments*<sup>1-6</sup>. Les patients avec des anticorps anti-RNP ont une plus faible incidence de désordre rénal comparé aux patients avec des anticorps anti-Sm. Les anticorps SS-A (Ro) et SS-B (La) apparaissent respectivement chez environ 30-40% et 10-15% des patients LED et 60-70% et 40-60% des patients avec un *syndrome de Sjögren*. Les anticorps anti-SS-B (La) apparaissent fréquemment en association avec les anticorps anti-SS-A (Ro). Les anticorps anti-SS-A (Ro) apparaissent également dans 60% des patients atteints de *LE cutané subaigu*, dans la plupart des cas de LE néonatal et chez deux tiers des patients LED avec une déficience en C2<sup>10-13</sup>. Les anticorps anti-Scl-70 sont des marqueurs sérologiques spécifiques de la sclérodémie systémique. Des variations de fréquences d'anticorps anti-Scl-70 ont été reportées. Dans des études précédentes, cet anticorps était détecté chez environ 20% des patients atteints de sclérodémie mais des études ultérieures ont reporté une incidence de 75% chez les patients avec une sclérodémie diffuse et 44% chez les patients avec de l'acrosclérose<sup>5</sup>. Les anticorps spécifiques de myosites sont présents chez 25-40% des patients adultes avec des myopathies inflammatoires idiopathiques et sont dirigés principalement contre les synthétases cytoplasmiques t-RNA<sup>12</sup>. Parmi les cinq anticorps anti-synthétase décrits, les anticorps synthétase antihistidyl-tRNA (Jo-1) sont les plus fréquents chez les patients avec myosite et sont associés à des manifestations cliniques telles que la maladie interstitielle du poumon, la fibrose pulmonaire, le phénomène de Raynaud, la fièvre et l'arthrite symétrique non érosive des petites articulations<sup>12</sup>. Le test ELISA Profil ENA de Menarini™ utilise des antigènes hautement purifiés pour détecter les anticorps ENA aux six antigènes.

### PRINCIPES DU TEST

Le test ELISA est réalisé sur phase solide. Les micro-puits sont recouverts avec les antigènes purifiés Sm/RNP, RNP, SS-A (Ro), SS-B (La), Scl-70 ou Jo-1 suivi par un blocage des sites non réactifs pour réduire l'attache non spécifique. Le contrôle, l'étalon et les sérums de patients dilués sont ajoutés dans différents micro-puits, autorisant chaque anticorps anti-ENA présent à se lier à l'antigène. Les anticorps non liés et les autres protéines du sérum sont éliminés par les lavages des micro-puits. Les anticorps liés sont incubés avec un conjugué anti-IgG humaine marqué par une enzyme. Le conjugué non lié est éliminé par lavage.

L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat enzymatique (pNPP) suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Après avoir arrêté la production enzymatique de produit coloré, la présence ou l'absence d'anticorps spécifiques sera déterminée par lecture au spectrophotomètre.



Les résultats sont calculés et exprimés comme des ratios des échantillons de patients versus l'étalon et sont considérés comme négatifs, limites ou positifs.

## REACTIFS

### Conservation et Préparation

- Conserver tous les réactifs du coffret entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.**
- Ne pas employer le réactif s'il est trouble ou si un précipité s'est formé. Tous les réactifs doivent être portés à la température ambiante (20-25°C) avant de les utiliser.
- Les puits ne peuvent être utilisés qu'une seule fois.
- Reconstituer le tampon de lavage en y ajoutant de l'eau distillée ou déionisée pour un volume de 1L. Le tampon de lavage est stable jusqu'à la date limite d'utilisation s'il est conservé entre 2 et 8°C.

### Précautions

- Le matériel d'origine humaine utilisé a été testé en respectant les recommandations de la FDA et est négatif aux virus de l'hépatite B (Ag HBs), aux virus de l'hépatite C (HCV) et aux virus de l'immunodéficience humaine (VIH1, VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucun test connu ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage<sup>15</sup>.
- ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azides métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azides dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.
- La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption. Respecter les bonnes pratiques de laboratoire réduisant au minimum la contamination microbienne et chimique. Ne pas employer après la date d'échéance figurant sur l'étiquette.

### Matériel fourni

Menarini™ ELISA Profil ENA **REF** 39519

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 12 tests pour chacun des six antigènes.









12 x 8	<b>MICROPLATE ENA-P</b>	<b>Micro-plaques prêtes à l'emploi avec micro-puits individuels recouverts d'antigène ENA.</b>
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + ENA-P</b> *	<b>Contrôle Positif</b> ( <i>capuchon rouge</i> ), prêt à l'emploi. Contient du sérum humain.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR ENA-P</b> *	<b>Etalon</b> ( <i>capuchon vert</i> ), prêt à l'emploi. Contient du sérum humain.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ ALKPHOS</b> *	<b>Conjugué Phos. Alc. anti-IgG humaine, prêt à l'emploi.</b> Code couleur rose.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluant sérum</b> , prêt à l'emploi. Code couleur bleu.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrat enzymatique</b> , prêt à l'emploi. Contient du pNPP. <b>Protéger de la lumière.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solution d'arrêt</b> prête à l'emploi.

2 x flacons **BUF** **WASH**

**Tampon de lavage** en poudre. Reconstituer pour 1 litre d'eau distillée ou déionisée / flacon.

\* Contient < 0.1% NaN<sub>3</sub>

**Symboles utilisés sur les étiquettes:**

-  Numéro de lot
-  Numéro de référence catalogue
-  A utiliser avant
-  Température de conservation
-  Lire les instructions d'utilisation
-  Pour usage diagnostique In vitro
-  Fabricant
-  Nombre de tests

**Matériel nécessaire mais non fourni**

- Eau distillée ou déionisée
- Pissette pour le tampon de lavage
- Pipettes de 5 à 1000 µl
- Embouts de pipette jetables
- Tubes à essais 12 X 75 mm et portoir de tubes
- Chronomètre
- Papier absorbant
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm. Si la double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence sera de 600-650 nm.
- Laveur automatique capable de distribuer 300 µl

**PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS**

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

**METHODE**

**Préparation du test**

- Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.
- Remettre immédiatement les barrettes non utilisées dans le sachet contenant le dessiccateur, le refermer hermétiquement pour empêcher toute condensation sur les puits non utilisés. Replacer immédiatement le sachet au réfrigérateur.
- Laisser les échantillons et réactifs s'équilibrer à la température de la pièce pendant au moins 60 mn avant l'utilisation. Replacer les produits au réfrigérateur immédiatement après l'utilisation.

- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- Il est important d'utiliser une bonne technique de lavage. Si l'opération est réalisée manuellement, diriger un bon jet de tampon de lavage à l'aide d'une pissette sur toute la superficie de la microplaque. **Il est recommandé d'utiliser un laveur automatique de microplaques.**
- Utiliser une pipette multicanaux capable de remplir 8 puits simultanément. Ceci rend le processus plus rapide et fournit un temps d'incubation plus uniforme.
- La synchronisation est importante. Les périodes d'incubation commencent dès la fin de la distribution des réactifs.
- L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit être réalisé à la même cadence et selon la même séquence.

### Exécution du test

- Etape 1** Laisser tous les réactifs s'équilibrer à température ambiante.
- Etape 2** Indiquer sur une feuille de pailleuse la position des échantillons sur la microplaque. Il est de bonne pratique de tester les échantillons en duplicate.
- Etape 3** Préparer une dilution de **1:101** de l'échantillon patient en pipetant **5µl** de sérum dans **0.5 ml** de diluant. **Bien mélanger.**
- Etape 4** Prélever les micro-puits nécessaires du sachet et replacer les barrettes non utilisées dans le récipient fermé au réfrigérateur.
- Etape 5** Distribuer **100 µl** d'étalon, de contrôle positif et de sérums de patients prêts à l'emploi dans les micro-puits correspondants, comme indiqué dans le schéma ci-dessous :

Antigen		1	2	3	4
ENA Control	A	POS	POS	POS	POS
ENA Callibrator	B	CAL	CAL	CAL	CAL
Sm/RNP	C	S1	S2	S3	S4
Sm	D	S1	S2	S3	S4
SS-A (Ro)	E	S1	S2	S3	S4
SS-B (La)	F	S1	S2	S3	S4
Scl70	G	S1	S2	S3	S4
Jo-1	H	S1	S2	S3	S4
		1	2	3	4

### Disposition échantillon

S=Echantillon

- Etape 6** Incuber **30 minutes** ( $\pm$  5 min) à température ambiante.
- Etape 7** Laver **4x** avec le tampon de lavage. Pour le lavage manuel, remplir chaque puits avec du tampon de lavage reconstitué. Eliminer le liquide en retournant et en tapotant la plaque pour éliminer le contenu de chaque micro-puits ou aspirer le liquide de chaque micro-puits. Après le dernier lavage, retourner la plaque et la tapoter énergiquement sur du papier absorbant pour enlever tout liquide de



lavage résiduel. Pour le lavage automatique, programmer la machine selon les recommandations du fabricant.

- Etape 8** Pipeter **100 µl** de conjugué dans les puits.
- Etape 9** Incuber **30 minutes** ( $\pm$  5 min) à température ambiante.
- Etape 10** Laver tous les puits comme à l'étape 7.
- Etape 11** Pipeter **100 µl** de substrat enzyme dans chaque micro-puits dans le même ordre chronologique que pour le conjugué.
- Etape 12** Incuber **30 minutes** ( $\pm$  5 min) à température ambiante.
- Etape 13** Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque micro-puits en utilisant dans le même ordre chronologique que pour l'addition du substrat enzyme. Lire les valeurs d'absorbance dans l'heure qui suit l'addition de la solution d'arrêt.
- Etape 14** Lire l'absorbance de chaque micro-puits à **405nm** en monochromatique ou à **405/630nm** en bichromatique.

### Contrôle qualité

L'étalon et le Contrôle Positif doivent être présents dans chaque session pour garantir l'intégrité et la précision du test. Le ratio Contrôle Positif versus Etalon doit se situer dans la gamme indiquée sur l'étiquette du flacon du Contrôle Positif ; sinon le test doit être répété. Si le test est réalisé en duplicate, prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer le ratio.

### RESULTATS

#### Calculs

#### Abs. de l'Echantillon

----- = Ratio

#### Abs. du Etalon

Le test ELISA Profil ENA est un test qualitatif. Cette méthode de calcul devrait être utilisée uniquement pour déterminer si l'échantillon est positif ou négatif. Une corrélation directe avec la concentration de l'anticorps n'est pas applicable avec cette méthode. Cette concentration doit être déterminée par une méthode semi-quantitative spécifique aux Sm/RNP, Sm, SS-A(Ro), SS-B (La), Scl70 et Jo-1.

#### Interprétation

Les indications suivantes servent uniquement de guide dans l'interprétation des résultats.

#### Rapport Interprétation

< 1.0	Négatif
1.0 – 1.1	Limite (Indéterminé)
> 1.1	Positif

### LIMITATIONS D'UTILISATION

Le test ELISA Profil ENA ne devrait pas être réalisé sur des échantillons fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne. Cette méthode doit être utilisée pour tester des échantillons de sérum humain uniquement. Le diagnostic ne doit pas être fait uniquement sur la base des résultats de test ELISA. Des résultats positifs doivent être confirmés par un test quantitatif.


**VALEURS ATTENDUES**

L'incidence des anticorps ENA dans différents désordres du tissu conjonctif est résumée dans le tableau suivant:

**Signification Diagnostique des Anticorps de Différents Antigènes Nucléaires Solubles**

<b>Isotype Anticorps</b>	<b>Maladie Associée</b>
Sm	LED - 10-40%
RNP	LED - 20-30%
	MCTD - 95-100%
SS-A (Ro)	LED - 15-33%
	SCLE - 60%
	LE Néonatale - 100%
	Syndrome de Sjögren - 40-70%
SS-B (La)	LED - 10-15%
	SCLE - 25%
	Syndrome de Sjögren - 15-60%
Jo-1	Polymyosite - 32%
	Recouvrement polymyosite
	Dermatomyosite - 20%
Scl-70	Sclérodermie - 20-40%
	Acrosclérose - 44%

LED = lupus érythémateux disséminé

MCTD = *désordres variés du tissu conjonctif*

SCLE = lupus érythémateux cutané subaigu

Note: La fréquence de chaque anticorps dans la maladie représente une compilation de la littérature

<sup>3</sup>. L'incidence varie selon la population de patients.



## REFERENCES

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, et al 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

**UK**

**UNITED KINGDOM**

Distributed by

A. Menarini Diagnostics Ltd  
405 Wharfedale Road  
Winnersh - Wokingham  
Berkshire RG41 5RA

**EL**

Διανέμεται στην  
**ΕΛΛΑΔΑ** από την

A. Menarini Diagnostics S.A.  
575, Vouliagmenis Ave.  
16451 Argyroupolis  
Attiki

**ES**

**ESPAÑA**

Distribuido por

A. Menarini Diagnostics  
S.A.  
Avenida del Maresme, 120  
08918 Badalona  
Barcelona

**DE**

**DEUTSCHLAND**

Vertrieb durch

A. Menarini Diagnostics  
Eine Division der Berlin-  
Chemie AG  
Glienicke Weg 125  
12489 Berlin

**AT**

**ÖSTERREICH**

Vertrieb durch

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

**FR**

**FRANCE**

Distribué par

A. Menarini Diagnostics  
France S.A.R.L.  
3-5, Rue du Jura  
BP 70511  
94633 Rungis Cedex

**BE**

**BELGIQUE**

Distribué par

A. Menarini Diagnostics  
Benelux S.A./N.V.  
Belgicastraat, 4  
1930 Zaventem

**IT**

**ITALIA**

Distribuito da

A. Menarini Diagnostics  
Via lungo l'Ema, 7  
50012 Bagno a Ripoli  
Firenze

**PT**

**PORTUGAL**

Distribuído 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

EN > Date of issue: May 2008

EL > Ημερομηνία έκδοσης: Μάιος 2008

ES > Fecha de emisión: Mayo de 2008

DE > Ausgabedatum: Mai 2008

FR > Date d'émission : Mai 2008

IT > Data di pubblicazione: Maggio 2008

PT > Data de publicação: Maio de 2008

Document No. PI4196 M

