



AUTO I.D.® SISTEMA DE ANÁLISIS DE AUTOANTICUERPOS Sm/RNP

Para uso diagnóstico in vitro
Para El Uso Profesional

USO PREVISTO: Se trata de un sistema de análisis por inmunodifusión de tipo Ouchterlony para la detección de autoanticuerpos contra los antígenos Sm (Smith), RNP (ribonucleoproteína U1) y otros en suero humano. Los resultados de este sistema de análisis pueden ser de ayuda en el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico, de las enfermedades mixtas del tejido conjuntivo o de otras enfermedades reumáticas.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Las proteínas celulares solubles en suero salino se denominan antígenos nucleares extraíbles o ENA. Los anticuerpos anti-ENA se han asociado a diversos síndromes autoinmunitarios, y parecen tener un significado diagnóstico y/o pronóstico en la esclerosis sistémica (1, 2), las enfermedades mixtas del tejido conjuntivo (3-5), el síndrome de Sjögren (6, 7), la polimiositis (8), la dermatomiositis (9), el lupus eritematoso sistémico (5) y la artritis reumatoide (10). Algunos de los anticuerpos específicos más habituales son: Smith (Sm); ribonucleoproteína (RNP o U1-RNP); SSA/Ro; SSB/La; Jo-1; Scl-70; y el antígeno nuclear celular proliferador (PCNA) (11). Se ha empleado análisis de anticuerpos antinucleares (ANA) para la detección selectiva de estos anticuerpos, pero los ANA no indican la especificidad del anticuerpo, y algunos anticuerpos anti-ENA no dan positivo en el análisis de ANA (12, 13). Por eso es muy recomendable realizar una evaluación secundaria de confirmación de los anticuerpos anti-ENA (14).

El antígeno Sm (Smith) fue identificado en 1966 por Tan y Kunkel como una glucoproteína no histona soluble en suero salino, que no depende del ADN ni del ARN para su poder antigénico (15). Se considera que los anticuerpos anti-Sm son un marcador serológico específico, debido a su elevado grado de especificidad por el LES. Se observan en hasta el 40% de los pacientes con LES, y se han asociado a nefropatías activas y a cerebritis (16-19).

En el suero de pacientes con LES es frecuente encontrar anticuerpos anti-Sm junto con anticuerpos anti-RNP U1 (20, 21). Al contrario que los anticuerpos anti-Sm, los anticuerpos anti-RNP no se consideran marcadores serológicos específicos, pues se encuentran en pacientes con diversas enfermedades reumáticas como LES, esclerodermia, síndrome de Sjögren y artritis reumatoide. No obstante, los niveles elevados de anticuerpos anti-RNP presentan una elevada asociación a un síndrome intermedio denominado enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC). Los pacientes con EMTC se caracterizan por una combinación de datos clínicos que se observan en el LES, la esclerodermia y la polimiositis. A menudo, estos pacientes demuestran una buena respuesta al tratamiento con corticosteroides, y presentan una incidencia menor de enfermedades renales que los pacientes con LES (21, 22).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Existen diversas pruebas para la detección de anticuerpos específicos de los antígenos nucleares. Los métodos más habituales son la inmunodifusión de Ouchterlony, la hemaglutinación pasiva, la contraelectroforesis y el ELISA (14). En la actualidad, el método de inmunodifusión (ID) de Ouchterlony es el más utilizado, por su comodidad y relativa facilidad de realización e interpretación.

El sistema de análisis de autoanticuerpos Sm/RNP AUTO I.D.® de Immuno Concepts para la detección de anticuerpos contra los antígenos nucleares Smith y ribonucleoproteína U1, emplea la técnica de ID de Ouchterlony. Para ello se sirve del preparado de antígenos nucleares exclusivos de Immuno Concepts que contiene diversos antígenos nucleares que reaccionan con los anticuerpos que se encuentran en pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas.

Se dispone el antígeno nuclear en un pocillo central de una placa de agarosa, y muestras de suero de control y de suero del paciente en los seis pocillos que lo rodean. Tras la incubación a temperatura ambiente, se forma una línea de precipitación en el gel de agarosa cuando el antígeno nuclear se difunde y se encuentra con el anticuerpo homólogo. En los sueros se analiza la especificidad de la unión antígeno/anticuerpo observando el parecido de las líneas de precipitación (total o parcial) de las muestras de los pacientes con los sueros de control. Los sueros que producen líneas de precipitación se consideran negativos. Los anticuerpos con especificidades diferentes pueden producir líneas no idénticas con respecto a los sueros de control utilizados en el análisis.

COMPONENTES DEL SISTEMA - MATERIALES SUMINISTRADOS

Utilización: Todos los sueros de control vienen listos para usar; no es necesario diluirlos, fraccionarlos ni prepararlos. El antígeno nuclear viene liofilizado y debe ser preparado con agua destilada o desionizada antes de su empleo.

Conservación: Todos los componentes se pueden conservar en el refrigerador a 2-10°C. El antígeno nuclear preparado debe ser utilizado en el plazo de 5 días, o conservado congelado en alícuotas a -20°C o menos.

Estabilidad: Todos los sueros de control son estables al menos durante 12 meses a partir de la fecha de fabricación. Las placas de agarosa son estables durante 24 meses a partir de la fecha de fabricación. El antígeno nuclear estabilizado es estable al menos durante 12 meses a partir de la fecha de fabricación. Tras la preparación, el antígeno nuclear es estable durante 5 días a 2-10°C, o 90 días congelado a -20°C o menos. Para que los resultados sean óptimos, conserve el antígeno preparado en alícuotas de 30 µl a -20°C o menos.

REACTIVOS

Antígeno nuclear AUTO I.D.® ANTIGEN: N° de catálogo 6050 (0,2 ml). Antígeno nuclear liofilizado extraído de mamíferos, que contiene antígenos Smith (Sm), ribonucleoproteína U1 (RNP), SSA/Ro, SSB/La y otros que suelen reaccionar con los anticuerpos de pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas. Cada vial debe mezclarse con 200 µl de agua destilada o desionizada antes de su empleo.

Preparación: Retire el tapón metálico del vial con antígeno nuclear. Levante el tapón de goma con cuidado para que el vial quede abierto. Quite este tapón y añada al vial 200 µl de agua destilada o desionizada. Vuelva a poner el tapón de goma y agite suavemente para disolver el contenido. Deje reposar el antígeno preparado durante al menos 30 minutos antes de su empleo, para asegurarse de que se disuelve por completo. El antígeno preparado puede tener un aspecto turbio u oscuro. Agite inmediatamente antes de su empleo.

Suero de control positivo Sm/RNP CONTROL +: N° de catálogo 6002 (0,5 ml). Vial listo para usar que contiene anticuerpos humanos que reaccionan con los antígenos nucleares Smith (Sm) y ribonucleoproteína U1 (RNP). Este suero produce intensas líneas de precipitación idénticas a las de los sueros de referencia de los CDC para estos antígenos.

Suero de control positivo Sm/RNP CONTROL +: N° de catálogo 6001 (0,5 ml). Vial listo para usar que contiene anticuerpos humanos que reaccionan con el antígeno nuclear ribonucleoproteína U1 (RNP). Este suero produce una sola línea de precipitación intensa idéntica a la del suero de referencia de los CDC para este antígeno.

ELEMENTOS NO REACTIVOS

Placas AUTO I.D.® PLATE: N° de catálogo 7010. Placas de agarosa con siete pocillos numerados para poder identificar fácilmente a los pacientes.

Preparación: Deje que la placa alcance la temperatura ambiente (18-25°C) antes de abrir la bolsa de aluminio. Saque la placa de la bolsa con cuidado. La condensación presente en la tapa interna de la placa se puede retirar con papel secante o con toallas de papel que no se deshilachen. Evite tocar la agarosa.

OTROS MATERIALES NECESARIOS - PERO QUE NO SE SUMINISTRAN

Pipetas volumétricas para suministrar volúmenes de 20 µl, 30 µl, 100 µl y 200 µl
Probetas
Agua desionizada o destilada
Dispositivo de iluminación y amplificación para inmunodifusión
Guantes desechables

COMPONENTES OPCIONALES DISPONIBLES

Si se obtiene una línea de precipitina positiva indefinida, existen otros sueros de control que se pueden añadir para determinar el tipo de anticuerpo. Repita el análisis con los correspondientes sueros de control listos para usar, situados en los pocillos adyacentes a la muestra del paciente, e interprete los resultados de acuerdo con las directrices que se recogen en la sección "Interpretación general".

Suero de control positivo de SSA/Ro **CONTROL| +**: N° de catálogo 7001 (0,5 ml). Vial listo para usar que contiene anticuerpos humanos que reaccionan con el antígeno nuclear SSA/Ro.

Suero de control positivo de SSA/Ro/SSB/La **CONTROL| +**: N° de catálogo 7002 (0,5 ml). Vial listo para usar que contiene anticuerpos humanos que reaccionan con los antígenos nucleares SSA/Ro y SSB/La.

Suero de control positivo de SSB/La **CONTROL| +**: N° de catálogo 7003 (0,5 ml). Vial listo para usar que contiene anticuerpos humanos que reaccionan con el antígeno nuclear SSB/La.

Suero de control positivo Jo-1 **CONTROL| +**: N° de catálogo 6004 (0,5 ml). Vial listo para usar que contiene anticuerpos humanos que reaccionan con el antígeno Jo-1.

Suero de control positivo Scl-70 **CONTROL| +**: N° de catálogo 6005 (0,5 ml). Vial listo para usar que contiene anticuerpos humanos que reaccionan con el antígeno nuclear Scl-70.

Suero de control positivo PCNA **CONTROL| +**: N° de catálogo 6006 (0,5 ml). Vial listo para usar que contiene anticuerpos humanos que reaccionan con el antígeno nuclear celular proliferador (PCNA).

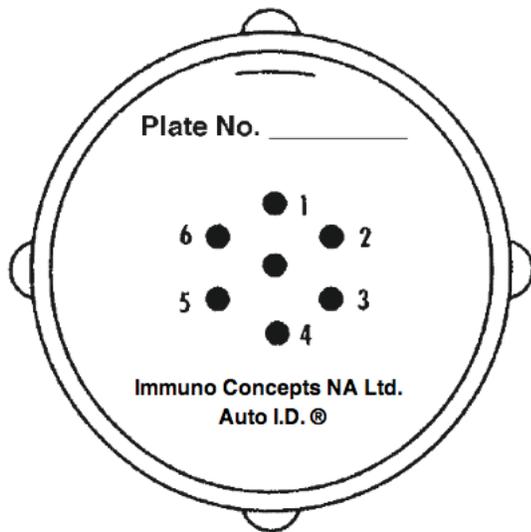
PRECAUCIONES

1. Todos los materiales de procedencia humana utilizados en este producto han sido analizados en busca de anticuerpos con el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), el virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2), el virus de la hepatitis C (VHC) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAG) con métodos homologados por la FDA, obteniendo resultados negativos (no reactivos en varias ocasiones) en todos los casos. Pero no existe ningún método de análisis que pueda garantizar por completo la ausencia de VIH-1, VIH-2, hepatitis C, hepatitis B u otros agentes infecciosos. Por eso, todos los materiales del kit deben ser manipulados como si fueran infecciosos.
2. Se emplea azida sódica (0,09%) como conservante. Al eliminar los reactivos, lavar con grandes volúmenes de agua del grifo para evitar que queden residuos en las tuberías. La azida sódica es venenosa y puede ser tóxica en caso de ingestión.
3. No congele las placas de AUTO I.D.[®] Para obtener resultados homogéneos, caliente siempre las placas a temperatura ambiente antes de su empleo.
4. Evite congelar y descongelar reiteradamente el antígeno nuclear preparado.
5. Siempre debe dejar reposa el antígeno nuclear recién preparado a temperatura ambiente durante 30 minutos como mínimo, para asegurarse de que se disuelve por completo.
6. Se pueden sustituir los componentes por los de otros sistemas de análisis de autoanticuerpos AUTO I.D.[®] de Immuno Concepts. Pero si se sustituyen por los de otros fabricantes, los resultados pueden ser incompatibles.
7. Si la temperatura del aire sufre cambios bruscos, se pueden producir artefactos en la formación de las líneas de precipitina. Para que los resultados sean óptimos, incube las placas a temperatura controlada y protegidas de las corrientes de aire. No incube a 37°C.

8. Algunos sueros pueden dar resultados falsos negativos debido al fenómeno prozona (exceso de anticuerpo). Si se sospecha del fenómeno prozona, repita la prueba con diluciones del suero del paciente en PBS.
9. Los sueros de algunos pacientes que contienen fosfolípidos pueden formar anchas bandas de precipitación en torno a la totalidad del pocillo de paciente. Esto no debe ser interpretado como reacción positiva.
10. Este sistema de análisis es para uso diagnóstico *in vitro*.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

El análisis AUTO I.D.® puede llevarse a cabo en uno o dos pasos; el primero es más corto y el segundo, más barato. A continuación se recomiendan normas generales para elegir el protocolo óptimo para los requisitos concretos de cada laboratorio.



Detección selectiva y/o confirmación con volumen escaso (método 1)

- Pocillo 1 - Paciente 1
- Pocillo 2 - Control con anticuerpo mono específico (RNP)
- Pocillo 3 - Paciente 2
- Pocillo 4 - Control con mezcla de anticuerpos (Sm/RNP)
- Pocillo 5 - Paciente 3
- Pocillo 6 - Control con mezcla de anticuerpos (Sm/RNP)
- Pocillo central - Antígeno nuclear

Detección selectiva y/o titulación con volumen elevado (método 2)

- Pocillo 1 - Paciente 1
- Pocillo 2 - Paciente 2
- Pocillo 3 - Paciente 3
- Pocillo 4 - Paciente 4
- Pocillo 5 - Paciente 5
- Pocillo 6 - Control con mezcla de anticuerpos (Sm/RNP)
- Pocillo central - Antígeno nuclear

Los sueros de pacientes que muestren líneas de precipitina con el método 2 al cabo de 18-24 horas, deben ser evaluados a continuación por el método 1 para determinar la especificidad.

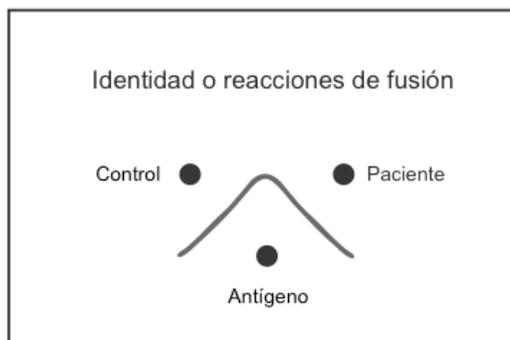
OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se obtendrá suero con técnica aséptica. Se separará el suero del coágulo cuanto antes, para que no se produzca hemólisis. No se utilizarán sueros que muestren un grado elevado de hemólisis, lipemia o crecimiento microbiano. Los sueros se pueden conservar a 2-10°C hasta 48 horas antes de utilizarlos. Si el análisis se posterga, los sueros deben conservarse congelados a una temperatura de -20°C o inferior.

RISULTADOS - INTERPRETACIÓN GENERAL

La correcta interpretación de los resultados de los pacientes depende de la resolución de la línea de precipitina formada entre los pocillos con suero de paciente y el de antígeno nuclear. La determinación de anticuerpos específicos en el paciente depende la interpretación previa de las líneas de precipitina formadas entre los pocillos con suero de paciente y el de antígeno nuclear.

Las siguientes definiciones deben servir como directriz básica para interpretar las reacciones entre los sueros de los pacientes y los de control.



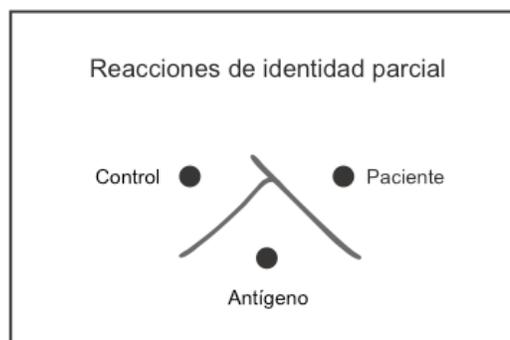
Una línea de precipitina continua que va del suero del paciente al de control indica la presencia de anticuerpos en todos los sueros que reaccionan con los mismos antígenos nucleares.

Las muestras de pacientes que presentan líneas de precipitina de identidad se consideran positivas, con anticuerpos idénticos a los del suero de control.



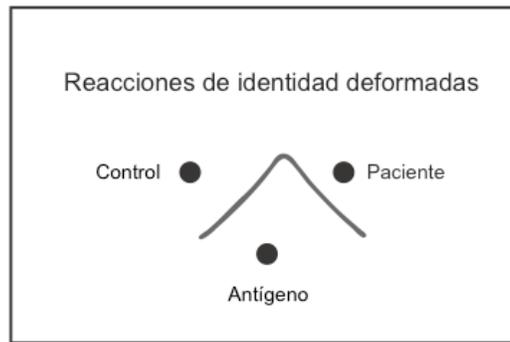
Si las líneas de precipitina se cruzan entre los sueros del paciente y los de control, ello indica que los anticuerpos de cada suero reaccionan con diferentes antígenos nucleares.

Las muestras que presentan líneas de precipitina de no identidad se consideran positivas con reactividad en “línea de precipitina no definida” (UPL). Se recomienda volver a analizarlas con otros controles para determinar los anticuerpos concretos (véase “Componentes opcionales disponibles”).



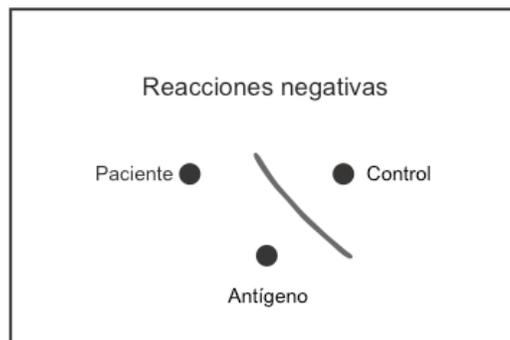
Si las líneas de precipitina forman un “espolón” entre los pocillos de pacientes y los de control, ello indica que los anticuerpos de esos sueros reaccionan con un antígeno idéntico, pero el suero del paciente también contiene un anticuerpo que reacciona con un antígeno diferente que no reacciona con el suero de control.

PRECAUCIÓN: Las reacciones de identidad parcial son las más difíciles de interpretar. A menudo, la línea de precipitina de control se curvará al contactar con la línea de precipitina del paciente. Debe observar atentamente las líneas de precipitación para asegurarse de que la del paciente no se cruza con la de control. En la sección “Interpretación técnica” puede consultar las reacciones de inhibición que pueden dar lugar a la formación de un “espolón” entre los sueros positivos con anticuerpos Sm y RNP adyacentes.



Si se forma una línea de precipitación continua deformada entre el paciente y el control, ello indica que los sueros reaccionan con antígenos nucleares idénticos, pero que el suero del paciente contiene más o menos anticuerpos que el de control.

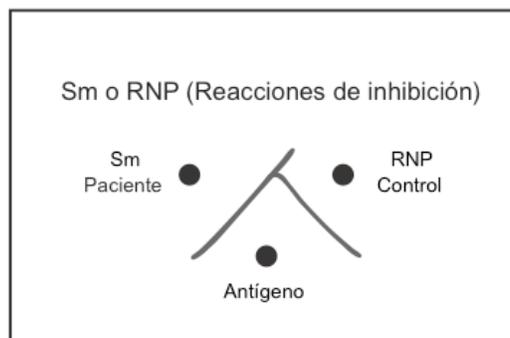
Las muestras de pacientes que muestran líneas de precipitina deformadas se consideran positivas, con anticuerpos idénticos a los del suero de control.



Sólo se forma línea de precipitina con el suero de control. Las muestras de pacientes que no forman líneas de precipitina se consideran negativas.

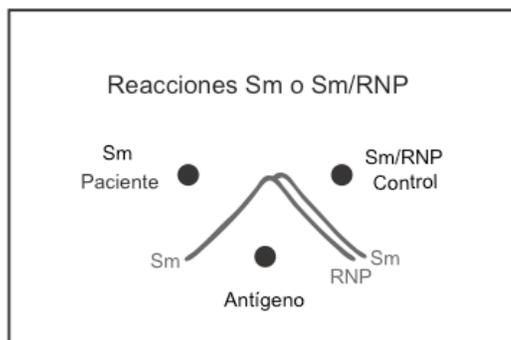
INTERPRETACIÓN TÉCNICA

Sm o RNP (Reacciones de inhibición)

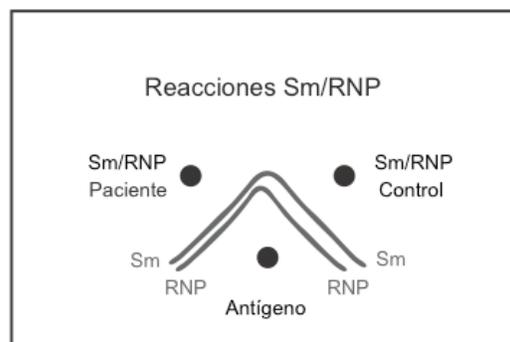
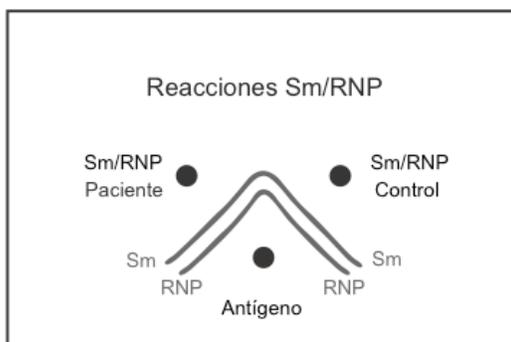


La diferenciación entre un suero positivo Sm y otro positivo RNP situados en pocillos adyacentes no siempre viene indicada por una reacción de no identidad. A menudo, los sueros con anticuerpos Sm adyacentes a los sueros de control con anticuerpos RNP muestran una reacción “en espolón” de identidad parcial con respecto a RNP. Resulta más adecuado interpretar esta reacción como de inhibición (23). No se produce una reacción de no identidad porque se inhibe el cruce de la línea de precipitina Sm por el anticuerpo anti-RNP, pues todas las partículas del antígeno RNP están formando complejos con el antígeno Sm. El antígeno Sm también puede estar presente como molécula libre o naciente, responsable de la reacción “en espolón”.

Sm o Sm/RNP

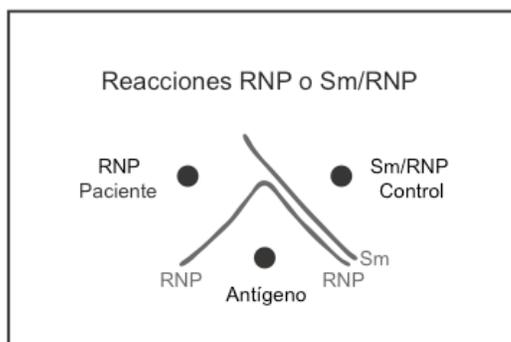


Puede ser difícil distinguir entre los sueros positivos con anticuerpos Sm y los positivos de control con anticuerpos Sm/RNP, porque las partículas de antígeno Sm están presentes en forma libre y formando complejos con el antígeno RNP. Es raro ver sueros positivos sólo para anticuerpos Sm. Pero cuando se encuentran, con frecuencia muestran una línea de precipitina precisa de identidad parcial con RNP, y una línea de precipitina de identidad con Sm.



Lo más frecuente es que los sueros positivos para anticuerpos Sm contengan también anticuerpos RNP. Estos sueros pueden presentar dos líneas de identidad correspondientes con los controles Sm/RNP. Lo más frecuente es que los sueros con anticuerpos Sm/RNP muestren una ancha línea de precipitina, en la que no resulta fácil distinguir las dos líneas. Con una solución superior del suero se puede mejorar la resolución.

RNP o Sm/RNP



Los sueros positivos para RNP sólo muestran una clara línea de precipitina de identidad con RNP cuando se encuentran adyacentes a sueros de control positivos con anticuerpos Sm/RNP.

Titulación

Se pueden utilizar sucesivas diluciones dobles de los sueros de los pacientes para disponer de una determinación semicuantitativa de la cantidad de anticuerpo específico en los sueros positivos. Además, la titulación puede ayudar a interpretar las reacciones que se producen cerca del pocillo con antígeno nuclear en la detección selectiva inicial, debido al exceso de anticuerpos. El título será la inversa de la última dilución en la que se observan líneas de precipitación claras de identidad con los sueros de control.

LIMITACIONES DEL ANÁLISIS

1. Aunque un resultado positivo puede ser sugerente de una enfermedad reumática sistémica, no debe considerarse diagnóstica, sino parte de la historia clínica general de un paciente.
2. Los sistemas de análisis AUTO I.D.[®] de Immuno Concepts han sido optimizados para detectar la mayoría de los pacientes con autoanticuerpos contra los antígenos Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, Jo-1 y PCNA. En ocasiones, algunas muestras con niveles de anticuerpos muy altos o muy bajos pueden dar resultados falsos negativos en un sistema de análisis por inmunodifusión de tipo Ouchterlony. La dilución de las muestras en PBS o la concentración de anticuerpo rellenando dos o tres veces los pocillos de pacientes pueden potenciar la detección de anticuerpos en estas muestras.
3. El antígeno nuclear de AUTO I.D.[®] de Immuno Concepts incluye una mezcla de autoantígenos de mamífero. Por eso, los sueros de los pacientes pueden presentar líneas de precipitina con algunos antígenos sin presentar reacciones de identidad con los sueros de control que se incluyen en este sistema de análisis. Estos sueros han de ser analizados de nuevo con sueros de control con antígenos distintos (véase “Componentes opcionales disponibles”).

VALORES ESPERADOS

Inmunoespecificidad de Autoanticuerpos contra antígenos nucleares (datos de la referencia 14)	
Anticuerpos anti:	Asociación a enfermedades:
Sm	LES: 25-40%; anticuerpo marcador
Nuclear RNP (U1-RNP)	EMTC: 95-100%; menor frecuencia en el LES, el lupus discoide, la ESP
SSA/Ro	Síndrome de Sjögren: 60-70%; LES: 30-40%; síndrome de lupus del recién nacido: 100%
SSB/La	Síndrome de Sjögren: 50-60%; LES: 10-20%
PCNA	LES: 10%; anticuerpo marcador
Scl-70	ESP: 15-20%; anticuerpo marcador
Jo-1	Polimiositis: 31%; anticuerpo marcador
PM-Scl (PM-1)	Superposición polimiositis/esclerodermia: 64%

Abreviaturas: LES = lupus eritematoso sistémico, EMTC = enfermedades mixtas del tejido conjuntivo, ESP = esclerosis sistémica progresiva, Sm = antígeno Smith, PCNA = antígeno nuclear celular proliferador.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Detección: El sistema de análisis de autoanticuerpos Sm/RNP AUTO I.D.[®] de Immuno Concepts ha sido evaluado con un total de 61 sueros de pacientes positivos y negativos, obtenidos de laboratorios de referencia cualificados (24). La coincidencia con los sueros evaluados fue del 96,7%. Hubo doce sueros positivos para anticuerpos RNP, dos para anticuerpos Sm/RNP y uno para anticuerpos Sm. Doce sueros mostraron “líneas de precipitina no definidas” (UPL). En una ulterior evaluación con el sistema de análisis de autoanticuerpos SSA/Ro/SSB/La AUTO I.D.[®] de Immuno Concepts, se encontraron ocho sueros positivos para anticuerpos SSB/La, uno para SSA/Ro y SSB/La, y tres para SSA/Ro. Treinta y dos sueros fueron negativos para todos los autoanticuerpos anti-antígenos nucleares detectables. Originalmente, los dos sueros discrepantes fueron designados positivos para los anticuerpos Sm y Sm/RNP, respectivamente. Posteriormente, estos sueros fueron analizados por triplicado con otro sistema comercializado, obteniendo resultados negativos todos los autoanticuerpos anti-antígenos nucleares detectables.

Precisión: Seis sueros positivos para los anticuerpos Sm o RNP fueron analizados por duplicado en tres ocasiones. En todos los casos se obtuvieron los mismos resultados: tres sueros fueron siempre positivos para los anticuerpos Sm y RNP; dos los fueron siempre para los anticuerpos RNP; y uno lo fue siempre para los anticuerpos RNP con otra línea de precipitina no definida.

BIBLIOGRAFICI

1. Douvas, A.S., Achten, M., and Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *J. Biol. Chem.* 254:10514-10522, 1979.
2. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzier, M.J., et al. Autoantibodies to Centromere (Kinetochores) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1627-1631, 1980.
3. Cohen, M.L., Dawkins, B., Dawkins, R.L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
4. Sharp, G.C., Irwin, W.S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52:148-159, 1972.
5. Sharp, G.C., Irwin, W.S., May, L.M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm Antigens with mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus, and Other Rheumatic Diseases. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
6. Alspaugh, M.A., and Tan, E.M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1078, 1975.
7. Alspaugh, M.A., Talal, N., and Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
8. Wolfe, J.F., Adelstein, J.F., and Sharp, G.C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
9. Nishikai, M. and Reichlin, M. Purification and Characterization of a Nuclear Non-histone Basic Protein (Mi-1) which reacts with Anti-immunoglobulin Sera and the Sera of Patients with Dermatomyositis. *Mol. Immunol.* 17: 1129-1141, 1980.
10. Alspaugh, M.A., and Tan, E.M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration by Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 19:711-719, 1976.
11. von Mühlen, C.A. and Tan, E.M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. *Sem. Arthritis Rheum.* 24:323-358, 1995
12. Holden, D.J., Brownell, A.K.W., and Fritzier, M.J. Clinical and Serologic Features of Patients with Polymyositis or Dermatomyositis. *Can. Med. Assoc. J.* 132:649-653, 1985.
13. Hoy, E.S. Detection of Autoantibodies to the SSA/Ro Antigen: Comment on the Article by Boire et al (letter). *Arthritis Rheum.* 35:1109-1112, 1992.
14. Fritzier, M.J. and Tan, E.M. Antinuclear Antibodies and the Connective Tissue Diseases, p. 207-247. In Cohen, A.S. (ed.), *Laboratory Diagnostic Procedures in the Rheumatic Diseases (Third Edition)*. Grune and Stratton, Orlando, FL, 1985.
15. Tan, E.M. and Kunkel, H.G. Characteristics of a Soluble Nuclear Antigen Precipitating with Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 96:464-471, 1966.
16. Winfield, J.B., Brunner, C.M., and Koffler, D. Serological Studies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Central Nervous System Dysfunction. *Arthritis Rheum.* 21:289-294, 1978.
17. Nakamura, R.M. and Tan, E.M. Autoantibodies to Nonhistone Nuclear Antigens and Their Clinical Significance. *Hum. Pathol.* 14:392-400, 1983.
18. Hamburger, M., Hodes, S., and Barland, P. The Incidence and Clinical Significance of Antibodies to Extractable Nuclear Antigens. *Am. J. Med. Sci.* 273:21-28, 1977.
19. Lerner, M.R. and Steitz, J.A. Antibodies to Small Nuclear RNAs Complexed with Proteins are Produced by Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5495-5499, 1979.
20. Conner, G.E., Nelson, D., Wisniewolski, R., et al. Protein Antigens of the RNA-protein Complexes Detected by Anti-Sm and Anti-RNP Antibodies Found in Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Related Disorders. *J. Exp. Med.* 156:1475-1485, 1982.
21. Notman, D.D., Kurata, N., and Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Intern. Med.* 83:464-469, 1975.
22. Tan, E.M. Antinuclear Antibodies in Diagnosis and Management. *Hosp. Pract.* 18:78-84, 1983.
23. Nilsson, L.-Å. Double Diffusion-in-Gel. *Scand. J. Immunol.* 17(S10):57-68, 1983.
24. Data on file. Immuno Concepts, Inc., Sacramento, California.

En caso de daños al envoltorio protector, póngase en contacto con Immuno Concepts antes de usar el producto.



Fabricante



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Limitación De la Temperatura



Contiene suficiente para <n> pruebas



Consulte las instrucciones de uso



Dispositivo Médico De diagnóstico In vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 6000-I,

4.11.02.003.096-Es

Rev 3.0 © Copyright 2014

PROCEDIMIENTO DE LA ANÁLISIS DE AUTO-I.D.®

- 1. PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO NUCLEAR**

Prepare el vial de antígeno nuclear añadiendo 200 µl de agua destilada o desionizada. Deje reposar el vial preparado durante 30 minutos como mínimo a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su empleo, para asegurarse de su completa disolución. Agite suavemente antes de su empleo.

NOTA: El antígeno preparado puede tener un aspecto turbio u oscuro. Para que los resultados sean óptimos, conserve el antígeno preparado en alícuotas de 30 µl a – 20°C o menos. Deje que el antígeno alcance la temperatura ambiente antes de su empleo.
- 2. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS AUTO I.D.®**

Deje que la placa alcance la temperatura ambiente (18-25°C) antes de abrir la bolsa de aluminio. Saque la placa de la bolsa con cuidado. La condensación presente en la tapa interna de la placa se puede retirar con papel secante o con toallas de papel que no se deshilachen. Evite tocar la agarosa.
- 3. PREPARACIÓN DE LA HOJA DE TRABAJO AUTO I.D.®**

Para cada muestra evaluada, anote el número de placa, la especificidad de control según el número de pocillo y la identificación del paciente por número de pocillo. Anote también en la hoja de trabajo AUTO I.D.® el número de lote del sistema de análisis de autoanticuerpos AUTO I.D.®.
- 4. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PACIENTE (OPCIONAL)**

Puede ser necesario diluir las muestras de los pacientes, para su titulación o si se observa un fenómeno de prozona (exceso de anticuerpos). Prepare diluciones de las muestras de los pacientes con suero salino tamponado con fosfato (PBS). Disuelva las muestras de los pacientes a 1:2 añadiendo 100 µl de muestra sin diluir a 100 µl de PBS. Para seguir con la titulación, prepare series sucesivas de diluciones de la muestra de suero al doble (p.ej., 1:2, 1:4, 1:8... 1:64), utilizando PBS.
- 5. RELLENADO DE LOS POCILLOS**

Ponga 20 µl de antígeno nuclear en el pocillo central de la placa AUTO I.D.®. Ponga 20 µl de muestra de paciente o de suero de control en los pocillos numerados, siguiendo uno de los formatos recomendados que se describen en "métodos de análisis". Vuelva a poner la tapa.
- 6. DOBLE RELLENADO CON MUESTRAS DE PACIENTE (OPCIONAL)**

En ocasiones, algunas muestras con niveles de anticuerpos muy altos o muy bajos pueden dar resultados negativos muy débiles o falsos en un sistema de análisis por inmunodifusión de tipo Ouchterlony. Si en los pocillos del paciente se aumenta la concentración del anticuerpo al doble o al triple, se puede mejorar la detección en estas muestras. Para ello, se rellena el pocillo del paciente con otros 20 µl de suero al cabo de 30 minutos aproximadamente.
- 7. INCUBACIÓN DE LAS PLACAS**

Coloque cuidadosamente las placas rellenas en una caja pequeña para protegerlas de las corrientes de aire e incúbelas a temperatura ambiente (18-25°C) durante 24 horas. No incube a 37°C.

PRECAUCIÓN: Las corrientes de aire y las variaciones bruscas de temperatura pueden producir artefactos en la formación de las líneas de precipitina. Para que los resultados sean óptimos, incube las placas a temperatura controlada.
- 8. INTERPRETACIÓN DE LAS PLACAS**

Al cabo de 18-24 horas, observe las placas con un dispositivo amplificador iluminado. Consulte la sección "Interpretación" para conocer las directrices recomendadas para la interpretación de las líneas de precipitina.

NOTA: Para la mayor parte de los sueros, los resultados son visibles en un plazo de 18 horas. Con algunos sueros con títulos bajos, las líneas de precipitina pueden verse mejor al cabo de 24 y 48 horas.

ASISTENCIA TÉCNICA: +1-916-363-2649
o correo electrónico:
technicalsupport@immunoconcepts.com