



AUTO I.D.[®] SYSTÈME DE TEST DES AUTO-ANTICORPS Sm/RNP

Pour utilisation diagnostique in vitro
Pour l'Usage Professionnel

UTILISATION PRÉVUE: Il s'agit d'un système de test d'immunodiffusion Ouchterlony pour la détection des auto-anticorps anti-Sm (Smith), anti-RNP (U1-ribonucléoprotéine) et d'autres auto-antigènes dans le sérum humain. Les résultats de ce système de test peuvent être utilisés comme aide au diagnostic du lupus érythémateux disséminé, de la connectivité mixte ou d'autres maladies rhumatismales.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Les protéines cellulaires solubles en milieu salin sont appelées antigènes nucléaires solubles (ENA). Les anticorps anti-ENA ont été associés à plusieurs syndromes auto-immuns et semblent avoir une valeur diagnostique et/ou pronostique dans la sclérodermie (1, 2), la connectivité mixte (3-5), le syndrome de Sjögren (6, 7), la polymyosite (8), la dermatomyosite (9), le lupus érythémateux disséminé (5) et la polyarthrite rhumatoïde (10). Les spécificités des anticorps les plus courantes sont notamment: Smith (Sm), ribonucléoprotéine (RNP ou U1-RNP), SSA/Ro, SSB/La, Jo-1, Scl-70 et PCNA (antigènes nucléaires de prolifération cellulaire) (11). Le test ANA (anticorps anti-nucléaires) a été utilisé pour dépister ces anticorps mais il n'indique pas la spécificité de l'anticorps, et les anticorps dirigés contre certains antigènes nucléaires solubles ne sont pas positifs au test ANA (12, 13). Par conséquent, un second test de confirmation de la présence d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles est fortement recommandé (14).

L'antigène Sm a été identifié en 1966 par Tan et Kunkel. Il s'agit d'une glycoprotéine non histone soluble saline, non dépendante de l'ADN ou de l'ARN quant à son antigénicité (15). Les anticorps anti-Sm sont considérés comme un marqueur très spécifique en raison de leur degré élevé de spécificité au LED. Ils sont présents chez plus de 40% des patients atteints d'un LED et ont été associés à la néphropathie évolutive et à la cérébrite (16-19).

L'anticorps Sm est souvent associé à l'anticorps U1-RNP dans les sérums de patients atteints d'un LED (20, 21). À l'inverse de l'anticorps Sm, l'anticorps RNP n'est pas considéré comme un marqueur sérologique spécifique car on observe sa présence chez les patients atteints de diverses maladies rhumatismales, notamment d'un LED, du syndrome de Sjögren et de polyarthrite rhumatoïde. Cependant, la seule présence d'anticorps anti-RNP à titrage élevé est souvent associée à un syndrome de chevauchement appelé connectivité mixte (MCTD). Les patients atteints d'une MCTD présentent la plupart du temps une association de signes cliniques observés dans le LED, la sclérodermie et la polymyosite. Par ailleurs, ces patients réagissent souvent bien à un traitement corticostéroïde et présentent une incidence de néphropathie plus faible que les patients atteints de LED (21, 22).

PRINCIPE DU TEST

Un certain nombre de dosages sont disponibles pour la détection des anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes nucléaires. Les méthodes les plus couramment utilisées sont l'immunodiffusion Ouchterlony, l'hémagglutination passive, la contre-immunoelectrophorèse et ELISA (14). La méthode d'immunodiffusion (ID) Ouchterlony est actuellement le dosage le plus largement utilisé en raison de sa praticité et de sa relative simplicité d'exécution et d'interprétation.

Le système de test des auto-anticorps Sm/RNP AUTO I.D.[®] d'Immuno Concepts pour la détection des anticorps anti-antigènes nucléaires Smith et U1-ribonucléoprotéine fait appel à la technique d'immunodiffusion Ouchterlony. Ce test doit être utilisé avec une préparation d'antigène nucléaire exclusive d'Immuno Concepts qui contient plusieurs antigènes nucléaires réagissant avec les anticorps observés dans les maladies rhumatismales systémiques. L'antigène nucléaire est placé dans un puits central d'une gélose d'agarose.



Les sérums de contrôle et les sérums de patient sont déposés sur les six puits périphériques. Après incubation à température ambiante, un arc de précipitation se forme dans la gélose d'agarose où l'antigène nucléaire se diffuse et entre en contact avec l'anticorps homologue. La spécificité des antigènes/anticorps des sérums est testée par visualisation des arcs de précipitation d'identité ou d'identité partielle entre les échantillons de patient et les sérums de contrôle. Les sérums qui ne génèrent pas d'arcs de précipitation sont considérés comme négatifs. Les anticorps avec différentes spécificités peuvent générer des lignes de non-identité lorsqu'ils sont comparés aux sérums de contrôle utilisés dans le dosage.

COMPOSITION DES SYSTÈMES - MATÉRIELS FOURNIS

Utilisation: Tous les sérums de contrôle sont prêts à l'emploi et ne demandent ni dilution, ni aliquotage, ni reconstitution. L'antigène nucléaire est lyophilisé et doit être reconstitué avant utilisation avec de l'eau distillée ou désionisée.

Conservation: Tous les composants peuvent être conservés au réfrigérateur entre 2 et 10°C. L'antigène nucléaire reconstitué doit être utilisé dans les 5 jours ou congelé après aliquotage à -20°C minimum.

Stabilité: Tous les sérums de contrôle sont stables pendant au moins 12 mois à compter de la date de fabrication. Les plaques d'agarose sont stables pendant 24 mois à compter de la date de fabrication. L'antigène nucléaire lyophilisé est stable pendant 12 mois à compter de la date de fabrication. Après reconstitution, il est stable pendant 5 jours entre 2 et 10°C ou 90 jours s'il est congelé à -20°C minimum. Pour obtenir des résultats optimaux, conserver l'antigène reconstitué en aliquotes de 30 µl à -20°C minimum.

RÉACTIFS

Antigène nucléaire AUTO I.D.® [ANTIGEN]: Réf. catalogue 6050 (0,2 ml). Antigène nucléaire lyophilisé (extrait de mammifère) contenant Smith (Sm), U1-ribonucléoprotéine (RNP), SSA/Ro, SSB/La et autres antigènes qui réagissent généralement avec les anticorps des patients atteints de maladies rhumatismales systémiques. Chaque flacon doit être reconstitué dans 200 µl d'eau distillée ou désionisée avant emploi.

Préparation: Retirer le bouchon métallique du flacon d'antigène nucléaire. Soulever soigneusement le septum en caoutchouc pour faire entrer l'air dans le flacon. Retirer le septum et ajouter 200 µl d'eau distillée ou désionisée dans le flacon. Remettre le septum en caoutchouc en place et agiter doucement par rotations afin de dissoudre le contenu. Laisser l'antigène reconstitué reposer pendant au moins 30 minutes avant utilisation pour s'assurer que l'antigène est totalement dissous. L'antigène reconstitué peut avoir une apparence trouble. Agiter immédiatement avant utilisation.

Sérum de contrôle positif Sm/RNP [CONTROL +]: Réf. catalogue 6002 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant aux antigènes nucléaires Smith (Sm) et U1-ribonucléoprotéine (RNP). Ce sérum présente des arcs de précipitation d'identité nets par rapport aux sérums de référence CDC pour ces antigènes.

Sérum de contrôle positif RNP [CONTROL +]: Réf. catalogue 6001 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant aux antigènes nucléaires U1-ribonucléoprotéine (RNP). Ce sérum présente un seul arc de précipitation d'identité net par rapport au sérum de référence CDC pour cet antigène.

COMPOSANTS NON RÉACTIFS

Plaques de AUTO I.D.® [PLATE]: Réf. catalogue 7010. Plaques d'agarose à sept puits prénumérotés qui permettent d'identifier aisément les patients.

Préparation: Laisser la plaque atteindre la température ambiante (18-25°C) avant d'ouvrir la poche en aluminium. Retirer soigneusement la plaque de la poche. Essuyer le cas échéant la condensation présente sur le couvercle intérieur de la plaque avec du papier absorbant ou des serviettes en papier qui ne peluchent pas. Éviter de toucher l'agarose.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE REQUIS - MAIS NON FOURNI

Pipettes volumétriques permettant de prélever 20 µl, 30 µl, 100 µl et 200 µl
Tubes à essai
Eau désionisée ou distillée
Négatoscope et loupe d'immunodiffusion
Gants jetables

COMPOSANTS OPTIONNELS DISPONIBLES

Si l'on obtient des résultats d'arcs de précipitation indéfinis positifs, des sérums de contrôle supplémentaires sont disponibles pour aider à la détermination de la spécificité des anticorps. Recommencer le test avec les sérums de contrôle prêts à l'emploi appropriés placés dans les puits adjacents à l'échantillon de patient puis l'interpréter selon les principes indiqués au paragraphe « Interprétation Générale ».

Sérum de contrôle positif SSA/Ro **CONTROL|+**: Réf. catalogue 7001 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant avec les antigènes nucléaires SSA/Ro.

Sérum de contrôle positif SSA/Ro/SSB/La **CONTROL|+**: Réf. catalogue 7002 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant avec les antigènes nucléaires SSA/Ro et SSB/La.

Sérum de contrôle positif SSB/La **CONTROL|+**: Réf. catalogue 7003 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant avec les antigènes nucléaires SSB/La.

Sérum de contrôle positif Jo-1 **CONTROL|+**: Réf. catalogue 6004 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant avec l'antigène Jo-1.

Sérum de contrôle positif Scl-70 **CONTROL|+**: Réf. catalogue 6005 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant avec l'antigène nucléaire Scl-70.

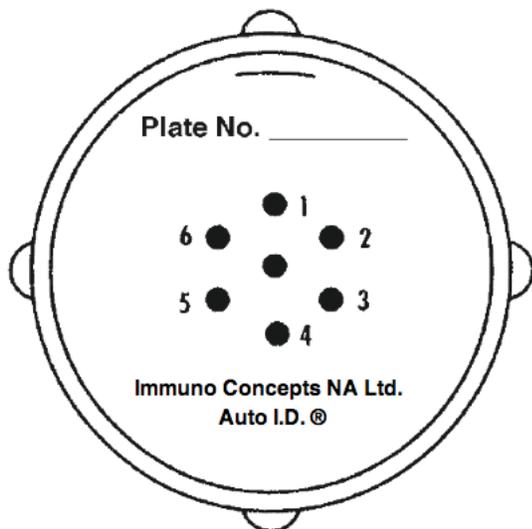
Sérum de contrôle positif PCNA **CONTROL|+**: Réf. catalogue 6006 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant avec les antigènes nucléaires de prolifération cellulaire (PCNA).

PRÉCAUTIONS

1. Tous les matériels d'origine humaine utilisés dans la composition de ce produit ont été testés et se sont révélés négatifs (non-réactivité répétée) vis-à-vis des anticorps des virus de l'immunodéficience humaine 1 et 2 (VIH 1 et 2), de l'anticorps du virus de l'hépatite C (HCV) et de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBSAg), selon les méthodes approuvées par la FDA. Néanmoins, aucune méthode de test ne peut assurer totalement l'absence de VIH-1, VIH-2, HCV, HBV ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, tous les matériels du kit doivent être manipulés de la même manière que des matériels considérés comme potentiellement infectieux.
2. L'azide de sodium (0,09%) est utilisé comme conservateur. Lors de l'élimination des réactifs, rincer abondamment les canalisations avec de l'eau afin d'éviter toute accumulation de résidus. L'azide de sodium est un poison et peut être toxique en cas d'ingestion.
3. Ne pas congeler les plaques AUTO I.D.[®] Afin d'obtenir de bons résultats, toujours utiliser des plaques amenées à température ambiante avant utilisation.
4. Éviter les congélations/décongélations successives de l'antigène nucléaire reconstitué.
5. Laisser systématiquement reposer l'antigène nucléaire fraîchement reconstitué pendant au moins 30 minutes à température ambiante avant utilisation pour s'assurer qu'il est totalement dissous.
6. L'utilisation de composants d'autres systèmes de test des auto-anticorps AUTO I.D.[®] d'Immuno Concepts est acceptable. Toute substitution des composants par ceux d'autres fabricants peut entraîner des résultats aberrants.
7. De brusques changements de température peuvent produire des artefacts. Pour obtenir des résultats optimaux, faire incuber les plaques dans un environnement à température contrôlée à l'abri des courants d'air. Ne pas incuber à 37°C.
8. Certains sérums peuvent donner des résultats faussement négatifs à cause d'un phénomène de prozone (excès d'anticorps). Si tel est le cas, recommencer le test en diluant le sérum de patient dans du PBS.
9. Certains sérums de patient contenant des phospholipides peuvent former de larges bandes de précipitation entourant la totalité du puits de patient. Cela ne doit pas être interprété comme une réaction positive.
10. Ce système de test est destiné à une utilisation diagnostique *in vitro*.

MÉTHODES DU TEST

Le test AUTO I.D.[®] peut être défini en protocoles à une ou deux étapes afin d'obtenir respectivement un temps d'exécution minimal ou une économie maximale. Suivent les principes généraux recommandés pour aider à définir un protocole optimal en fonction des exigences spécifiques de chaque laboratoire.



Analyse de faibles volumes et/ou test de confirmation (méthode 1)

- Puits 1 - Patient 1
- Puits 2 - Contrôle d'anticorps monospécifique (RNP)
- Puits 3 - Patient 2
- Puits 4 - Contrôle d'anticorps mixte (Sm/RNP)
- Puits 5 - Patient 3
- Puits 6 - Contrôle d'anticorps mixte (Sm/RNP)
- Puits central - Antigène nucléaire

Analyse de volumes élevés et/ou titrage (méthode 2)

- Puits 1 - Patient 1
- Puits 2 - Patient 2
- Puits 3 - Patient 3
- Puits 4 - Patient 4
- Puits 5 - Patient 5
- Puits 6 - Contrôle d'anticorps mixte (Sm/RNP)
- Puits central - Antigène nucléaire

Les sérums de patient qui présentent des arcs de précipitation après 18 à 24 heures selon la méthode 2 doivent être testés de nouveau quant à leur spécificité selon la méthode 1.

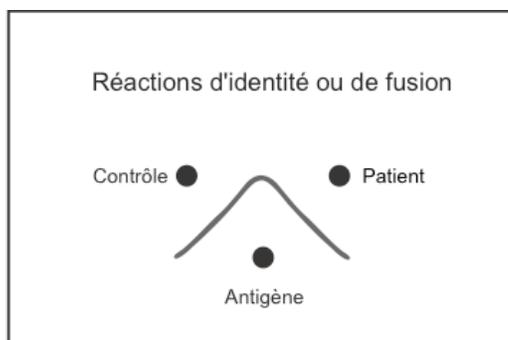
PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLIONS

Le sérum doit être recueilli de façon aseptique. Il doit être séparé du caillot aussi rapidement que possible, de façon à éviter l'hémolyse. Les sérums présentant un degré élevé d'hémolyse, de lipémie ou de prolifération microbienne doivent être écartés. Les sérums peuvent être conservés entre 2 et 10°C pendant 48 heures maximum avant utilisation. Si le test est reporté, ils doivent être congelés à -20°C minimum.

RÉSULTATS INTERPRÉTATION GÉNÉRALE

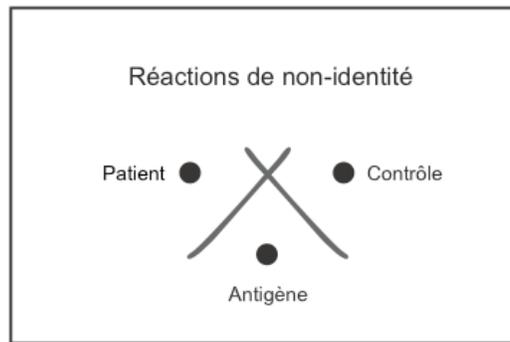
L'interprétation correcte des résultats des patients dépend de la bonne résolution de l'arc de précipitation entre le sérum de patient et les puits d'antigènes nucléaires. La détermination de la spécificité des anticorps du patient dépend de l'interprétation correcte des arcs de précipitation entre le sérum de patient et les puits de contrôle adjacents.

Les définitions suivantes doivent servir de principe général de base pour l'interprétation des réactions entre les sérums de patient et les sérums de contrôle.



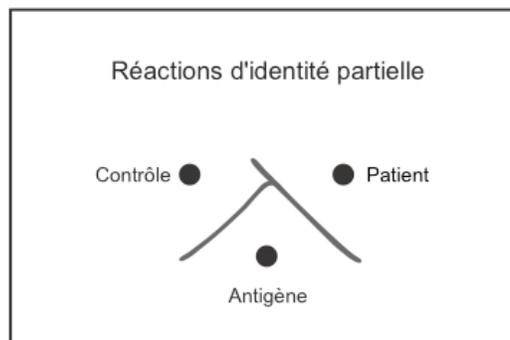
Les arcs de précipitation forment une ligne continue entre le sérum de patient et le sérum de contrôle: cela indique que les anticorps de chaque sérum réagissent avec les mêmes antigènes nucléaires.

Les échantillons de patient présentant des arcs de précipitation d'identité sont notés comme étant positifs avec une spécificité identique au contrôle.



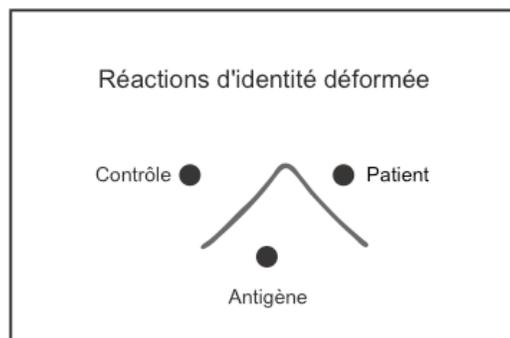
Les arcs de précipitation qui se croisent entre les sérums de patient et de contrôle indiquent que les anticorps de chaque sérum réagissent avec différents antigènes nucléaires.

Les échantillons présentant des arcs de précipitation de non-identité sont notés comme étant positifs avec une réactivité à « arc de précipitation indéfini » (UPL). Un test supplémentaire est requis avec d'autres contrôles afin de déterminer la spécificité des anticorps (voir « Composants optionnels disponibles »).



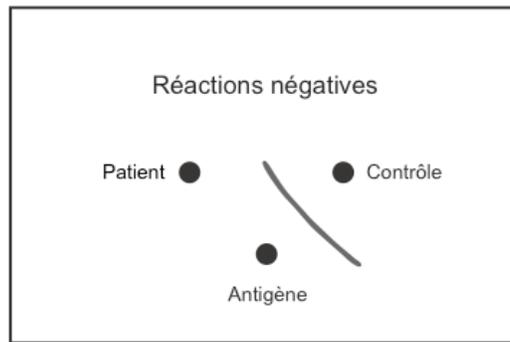
Les arcs de précipitation qui forment un « éperon » entre les puits de patient et de contrôle indiquent que les anticorps des sérums de patient et de contrôle réagissent avec le même antigène, mais le sérum de patient contient également un anticorps qui réagit avec un antigène différent ne réagissant pas avec le sérum de contrôle.

ATTENTION: Les réactions d'identité partielle sont les plus difficiles à interpréter. Souvent, l'arc de précipitation du contrôle s'incurve dans l'arc de précipitation du patient au point de contact. Examiner soigneusement les arcs de précipitation pour s'assurer que celui du patient ne croise pas celui du contrôle. Se reporter au paragraphe « Interprétation technique » pour les réactions d'inhibition qui peuvent générer la formation d'un « éperon » entre les sérums positifs aux anticorps Sm et RNP adjacents.



Les arcs de précipitation qui forment une ligne continue déformée entre patient et contrôle indiquent que chaque sérum réagit avec les mêmes antigènes nucléaires, mais le sérum de patient contient plus ou moins d'anticorps que le contrôle.

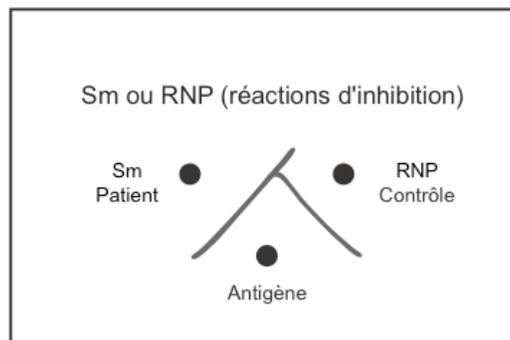
Les échantillons de patient présentant des arcs d'identité déformés sont notés comme étant positifs avec une spécificité identique au contrôle.



Un arc de précipitation se forme uniquement avec le sérum de contrôle. Les échantillons de patient qui ne forment pas d'arcs de précipitation sont notés comme étant négatifs.

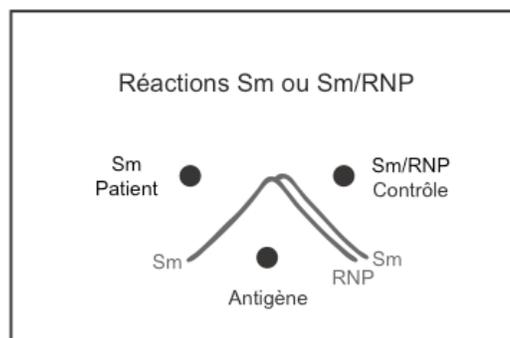
INTERPRÉTATION TECHNIQUE

Sm ou RNP (réactions d'inhibition)

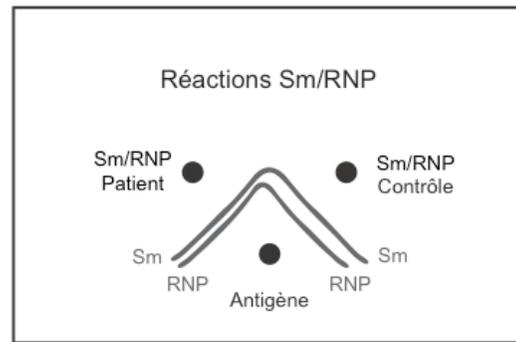
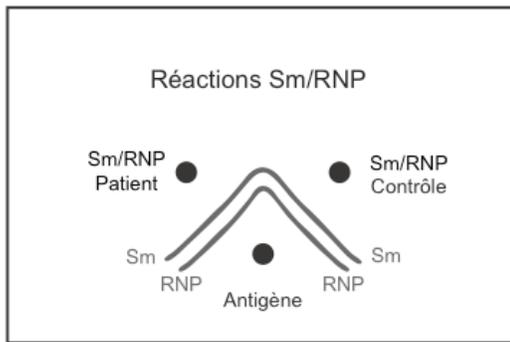


La distinction entre un sérum positif aux anticorps Sm et un sérum positif aux anticorps RNP dans des puits adjacents n'est pas toujours indiquée par une réaction de non-identité. Les sérums positifs aux anticorps Sm adjacents aux sérums de contrôle positifs aux anticorps RNP peuvent fréquemment présenter une réaction en « éperon » d'identité partielle par rapport au RNP. Il est plus approprié d'interpréter cette réaction comme une réaction d'inhibition (23). Il n'y a pas de réaction de non-identité car l'anticorps anti-RNP ne peut pas croiser l'arc de précipitation Sm puisque toutes les particules d'antigènes RNP sont liées à l'antigène Sm. L'antigène Sm peut également être présent sous forme de molécule libre ou nouvellement formée, responsable de la formation de la réaction en « éperon ».

Sm ou Sm/RNP

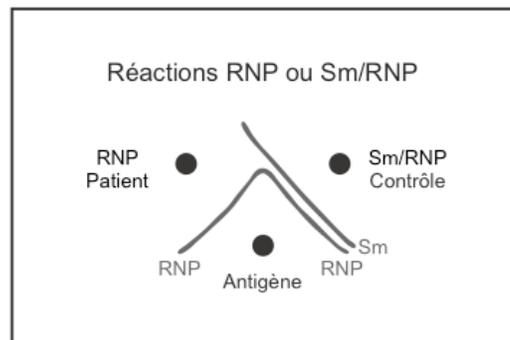


La distinction entre les sérums positifs aux anticorps Sm adjacents et les sérums de contrôle positifs aux anticorps Sm/RNP peut s'avérer difficile puisque les particules d'antigène Sm sont présentes sous forme de particules libres ou liées à l'antigène RNP. On observe rarement des sérums positifs aux anticorps Sm monospécifiques. Cependant, lorsque c'est le cas, ils présentent généralement un arc de précipitation net d'identité partielle par rapport au RNP et un arc de précipitation d'identité par rapport au Sm.



Plus fréquemment, les sérums positifs aux anticorps Sm contiennent également des anticorps anti-RNP. Ces sérums peuvent présenter deux arcs d'identité correspondants entre les contrôles Sm/RNP. Plus fréquemment, l'on peut observer les sérums positifs aux anticorps Sm/RNP comme un arc de précipitation large dans lequel les deux lignes ne sont pas clairement distinctes. Une dilution plus élevée du sérum peut donner une meilleure résolution.

RNP ou Sm/RNP



Les sérums positifs aux anticorps RNP monospécifiques présentent un arc de précipitation net d'identité par rapport au RNP lorsqu'ils sont adjacents aux sérums de contrôle positifs aux anticorps Sm/RNP.

Titrage

Des doubles dilutions successives des sérums de patient peuvent être utilisées pour obtenir une détermination semi-quantitative de la quantité d'anticorps spécifiques présents dans les sérums positifs. Le titrage peut également aider à l'interprétation des réactions survenant à proximité du puits d'antigène nucléaire lors du dépistage initial en raison de l'excès d'anticorps. Noter le titre comme étant l'inverse de la dernière dilution qui présente des arcs de précipitation nets d'identité par rapport aux sérums de contrôle.

LIMITES

1. Bien qu'un résultat positif fasse penser à une maladie rhumatismale systémique, il ne doit pas être considéré comme un élément diagnostique mais plutôt comme faisant partie des antécédents cliniques d'un patient.
2. Les systèmes de test AUTO I.D.[®] d'Immuno Concepts sont optimisés pour détecter la majorité des patients ayant des auto-anticorps dirigés contre les antigènes Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, Jo-1 et PCNA. Des échantillons ayant des niveaux d'anticorps très élevés ou très faibles peuvent parfois donner des résultats faussement négatifs dans un système de test d'immunodiffusion Ouchterlony. La dilution des échantillons dans du PBS ou la concentration des anticorps par double ou triple remplissage des puits de patient peuvent améliorer la détection des anticorps dans ces échantillons.
3. L'antigène nucléaire AUTO I.D.[®] d'Immuno Concepts inclut un mélange d'auto-antigènes de mammifères. Par conséquent, les sérums de patient peuvent comporter des arcs de précipitation avec des antigènes qui ne présentent pas de réactions d'identité avec les sérums de contrôle inclus dans ce système de test. Ces sérums doivent être testés de nouveau avec des sérums de contrôle par rapport à d'autres spécificités antigéniques (voir « Composants optionnels disponibles »).

VALEURS ESCOMPTÉES

Immunospecificité des auto-anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires (données provenant de la référence 14)	
Anticorps dirigés contre:	Associations cliniques:
Sm	LED: 25-40%; anticorps marqueur
RNP nucléaire (U1-RNP)	MCTD: 95-100%; fréquence plus faible en cas de LED, DE lupus discoïde ou de sclérodémie généralisée
SSA/Ro	Syndrome de Sjögren 60-70%; LED 30-40%; lupus néonatal: 100%
SSB/La	Syndrome de Sjögren 50-60%; LED 10-20%
PCNA	LED: 10%; anticorps marqueur
Scl-70	PSS: 15-20%; anticorps marqueur
Jo-1	Polymyosite: 31%; anticorps marqueur
PM-Scl (PM-1)	Chevauchement polymyosite/sclérodémie: 64%

Abréviations: LED = lupus érythémateux disseminé; MCTD = connectivité mixte; PSS = sclérodémie généralisée; Sm = antigène Smith; PCNA = antigène nucléaire de prolifération cellulaire.

PERFORMANCES

Détection: Le système de test des auto-anticorps Sm/RNP AUTO I.D.[®] d'Immuno Concepts a été testé sur un total de 61 sérums de patient positifs et négatifs provenant de laboratoires de référence agréés (24). On a obtenu un agrément de 96,7% sur l'ensemble des sérums testés. Douze sérums étaient positifs aux anticorps RNP, deux étaient positifs aux anticorps Sm/RNP et un était positif aux anticorps Sm. Douze sérums présentaient des « arcs de précipitation indéfinis » (UPL). Un test ultérieur avec le système de test des auto-anticorps SSA/Ro/SSB/La AUTO I.D.[®] d'Immuno Concepts a donné huit sérums positifs aux anticorps SSB/La, un positif aux anticorps SSA/Ro et SSB/La et trois positifs aux anticorps SSA/Ro. Trente-deux sérums étaient négatifs à tous les auto-anticorps détectables dirigés contre les antigènes nucléaires. Les deux sérums discordants ont initialement été notés comme positifs respectivement aux anticorps Sm et Sm/RNP. Ces sérums ont été testés en triple sur un autre test disponible sur le marché et se sont révélés négatifs à tous les auto-anticorps détectables dirigés contre les antigènes nucléaires.

Précision: Six sérums positifs aux anticorps Sm ou RNP ont été testés en double à trois occasions. Dans tous les cas, tous les résultats ont présenté des spécificités d'anticorps identiques: trois sérums étaient uniformément positifs aux anticorps Sm et RNP; deux étaient uniformément positifs aux anticorps RNP et un était uniformément positif aux anticorps RNP avec un autre arc de précipitation indéfini.

BIBLIOGRAPHIE

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 (Kinetochore) 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, 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.

Si l'emballage de protection est endommagé, veuillez contacter Immuno Concepts avant toute utilisation.



Constructeur



Représentant autorisé dans le Communauté européen



Limitation de la Température



Contient suffisamment pour <n> essais



Consultez les instructions pour l'usage



Dispositif Médical Diagnostique 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

PROCÉDURE DE TEST AUTO-I.D.®

- 1. RECONSTITUTION DE L'ANTIGÈNE NUCLÉAIRE**
Reconstituer le flacon d'antigène nucléaire par addition de 200 µl d'eau distillée ou désionisée. Laisser le flacon d'antigène reconstitué reposer pendant au moins 30 minutes à température ambiante (18-25°C) avant utilisation pour s'assurer que l'antigène est totalement dissous. Agiter doucement avant utilisation.
REMARQUE: L'antigène reconstitué peut avoir une apparence trouble. Pour obtenir des résultats optimaux, conserver l'antigène reconstitué en aliquotes de 30 µl à – 20°C minimum. Laisser l'antigène atteindre la température ambiante avant utilisation.
- 2. PRÉPARATION DE LA OU DES PLAQUES AUTO I.D.®**
Laisser la plaque atteindre la température ambiante (18-25°C) avant d'ouvrir la poche en aluminium. Retirer soigneusement la plaque de la poche. Essuyer le cas échéant la condensation présente sur le couvercle intérieur de la plaque avec du papier absorbant ou des serviettes en papier qui ne peluchent pas. Éviter de toucher l'agarose.
- 3. PRÉPARATION DU FORMULAIRE AUTO I.D.®**
Enregistrer le numéro de plaque, contrôler la spécificité ainsi que l'identification du patient par numéro de puits pour chaque échantillon à tester. Enregistrer également sur le formulaire AUTO I.D.® le numéro de lot du système de test des auto-anticorps AUTO I.D.® utilisé.
- 4. DILUTION DES ÉCHANTILLONS DES PATIENTS (FACULTATIF)**
Des dilutions des échantillons de sérums de patient peuvent être effectuées pour titrage ou dans le cas d'un phénomène de prozone (excès d'anticorps). Préparer ces dilutions avec du PBS (solution saline tamponnée au phosphate). Diluer l'échantillon du patient à 1:2 en ajoutant 100 µl d'échantillon pur (non dilué) à 100 µl de PBS. Pour poursuivre le titrage, procéder à des dilutions doubles successives de l'échantillon sérique (par ex. 1:2, 1:4, 1:8 ... 1:64) à l'aide du PBS.
- 5. REMPLISSAGE DES PUIITS**
Mettre 20 µl d'antigène nucléaire dans le puits central de la plaque AUTO I.D.®. Mettre 20 µl d'échantillon de patient ou de sérum de contrôle dans les puits numérotés selon l'un des formats recommandés au paragraphe « Méthodes du test ». Remettre le couvercle.
- 6. DOUBLE REMPLISSAGE DES ÉCHANTILLONS DES PATIENTS (FACULTATIF)**
Des échantillons ayant des niveaux d'anticorps très faibles peuvent parfois donner des résultats très faibles ou faussement négatifs dans un système de test d'immunodiffusion Ouchterlony. La concentration des anticorps par double ou triple remplissage des puits de patient peut améliorer la détection dans ces échantillons. La concentration des échantillons peut être obtenue par nouveau remplissage du puits de patient avec 20 µl de sérum supplémentaires environ 30 minutes après.
- 7. INCUBATION DES PLAQUES**
Placer soigneusement les plaques remplies dans une petite boîte pour les protéger des courants d'air et les faire incuber à température ambiante (18-25°C) pendant 18 à 24 heures. Ne pas incuber à 37°C.
ATTENTION: Les courants d'air et les brusques changements de température peuvent produire des artefacts. Pour obtenir des résultats optimaux, faire incuber les plaques dans un environnement à température contrôlée.
- 8. LECTURE DES PLAQUES**
Lire les plaques après 18 à 24 heures sur un négatoscope avec une loupe. Se reporter au paragraphe « Interprétation » pour les principes recommandés de lecture des arcs de précipitation.
REMARQUE: Pour la plupart des sérums, les résultats sont visibles au bout de 18 heures. Pour certains titres faibles, des arcs de précipitation plus distincts sont visibles à 24 heures, voire 48 heures.

POUR L'ASSISTANCE TECHNIQUE: +1-916-363-2649
ou courrier électronique:
technicalsupport@immunoconcepts.com

