



## **AUTO I.D.<sup>®</sup> SYSTÈME DE TEST DES AUTO-ANTICORPS SSA/Ro et SSB/La 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-SSA/Ro, anti-SSB/La 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, du syndrome de Sjögren 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).

Les SSA et SSB ont initialement été décrits comme des antigènes protéine-ARN nucléaire chez les patients atteints du syndrome de Sjögren (6, 7). Les Ro et La ont été décrits comme des antigènes protéine-ARN cytoplasmique chez les patients atteints de LED (15, 16). Il est maintenant largement reconnu que, d'une part, le SSA et le Ro et, d'autre part, le SSB et le La sont analogues et que ces antigènes se trouvent à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Les anticorps anti-SSA/Ro seuls ou anti-SSA/Ro et SSB/La sont observés chez 70 à 90% des patients souffrant de lupus cutané subaigu (11, 17) et chez 85% des patients atteints du syndrome de Sjögren qui développent une vascularite (18). Les anticorps anti-SSA/Ro seuls apparaissent chez les patients ayant un déficit homozygote de la fraction C2 (11, 19), chez les patients souffrant de cirrhose biliaire primitive qui développent le syndrome de Sjögren (20) et chez deux tiers des patients atteints de « LED négatif aux ANA » (21).

### **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 SSA/Ro et SSB/La AUTO I.D.<sup>®</sup> d'Immuno Concepts pour la détection des anticorps anti-antigènes nucléaires SSA/Ro et SSB/La 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.

**Contrôle positif SSA/Ro/SSB/La [CONTROL] +:** Réf. catalogue 7002 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant aux antigènes nucléaires SSA/Ro et SSB/La. Ce sérum présente des arcs de précipitation d'identité nets par rapport aux sérums de référence CDC pour ces antigènes.

**Contrôle positif SSA/Ro [CONTROL] +:** Réf. catalogue 7001 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant aux antigènes nucléaires SSA/Ro. Ce sérum présente un seul arc de précipitation d'identité net par rapport aux sérums 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 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 RNP [CONTROL] +**: Réf. catalogue 6001 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant avec les antigènes nucléaires U1-ribonucléoprotéine (RNP).

**Sérum de contrôle positif Sm/RNP [CONTROL] +**: Réf. catalogue 6002 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant avec les antigènes nucléaires Smith (Sm) et U1-ribonucléoprotéine (RNP).

**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.

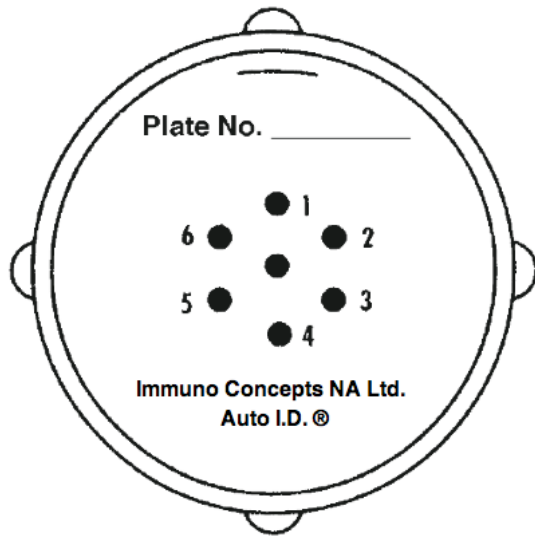
**Sérum de contrôle positif PCNA [CONTROL] +**: Réf. catalogue 6006 (0,5 ml). Flacon prêt à l'emploi contenant des anticorps humains réagissant avec les antigènes nucléaires de prolifération cellulaire (PCNA).

## 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.<sup>®</sup> 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.<sup>®</sup> 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.<sup>®</sup> 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 (SSA/Ro)
- Puits 3 - Patient 2
- Puits 4 - Contrôle d'anticorps mixte (SSA/Ro/SSB/La)
- Puits 5 - Patient 3
- Puits 6 - Contrôle d'anticorps mixte (SSA/Ro/SSB/La)
- 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 (SSA/Ro/SSB/La)
- Puits central - Antigène nucléaire

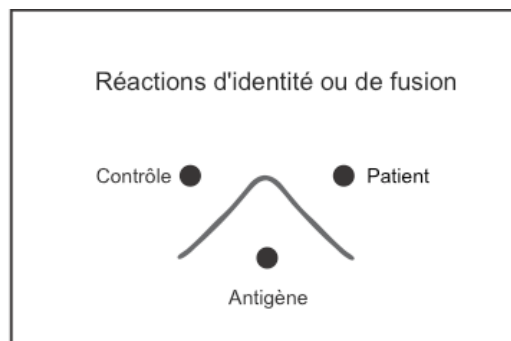
Les sérums de patient qui présentent des arcs de précipitation après 18 à 24 heures selon la méthode 2 doivent être testés de nouveau quant à leur spécificité selon la méthode 1.

## PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLIONS

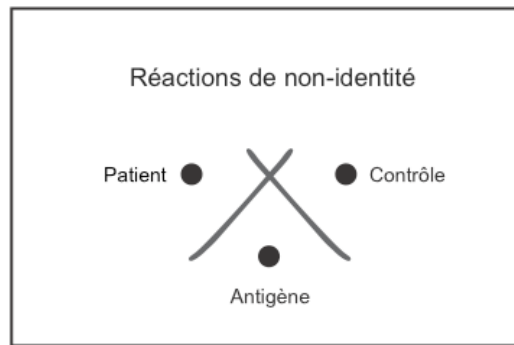
Le sérum doit être recueilli de façon aseptique. Il doit être séparé du caillot aussi rapidement que possible, de façon à éviter l'hémolyse. Les sérums présentant un degré élevé d'hémolyse, de lipémie ou de prolifération microbienne doivent être écartés. Les sérums peuvent être conservés entre 2 et 10°C 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.

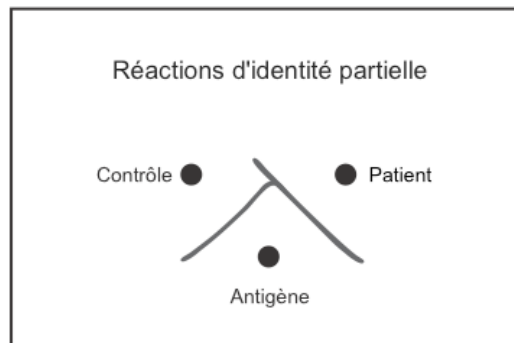


Les arcs de précipitation forment une ligne continue entre les sérums de patient et de contrôle: cela indique que les anticorps de chaque sérum réagissent avec les mêmes antigènes nucléaires. Les échantillons de patient présentant des arcs de précipitation d'identité sont notés comme étant positifs avec 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.

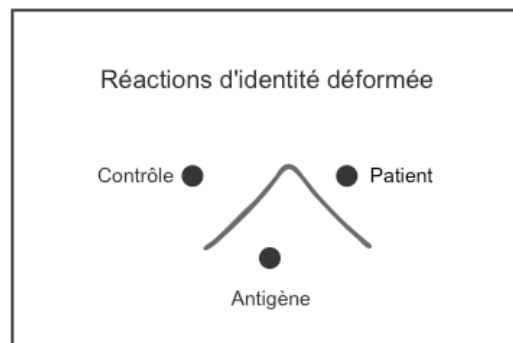
Les échantillons présentant des arcs de précipitation de non-identité sont notés comme étant positifs avec une réactivité à « arc de précipitation indéfini » (UPL). Un test supplémentaire est requis avec d'autres contrôles afin de déterminer la spécificité des anticorps (voir « Composants optionnels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



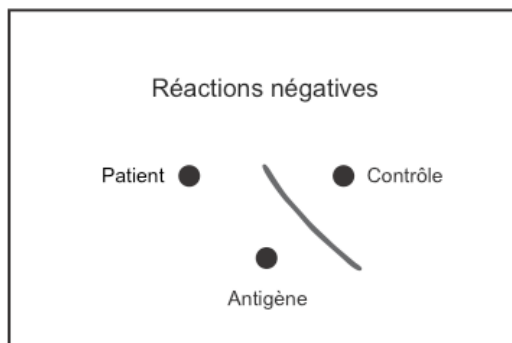
Les arcs de précipitation qui forment un « éperon » entre les puits de patient et de contrôle indiquent que les anticorps des sérums de patient et de contrôle réagissent avec le même antigène, mais le sérum de patient contient également un anticorps qui réagit avec un antigène différent ne réagissant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

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



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

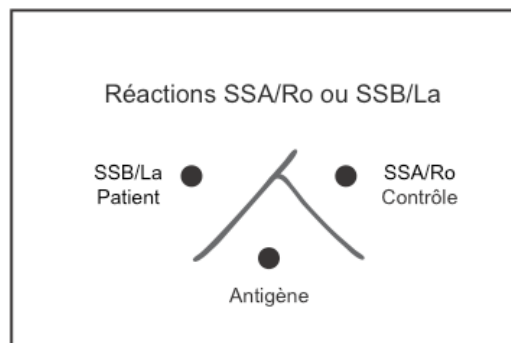
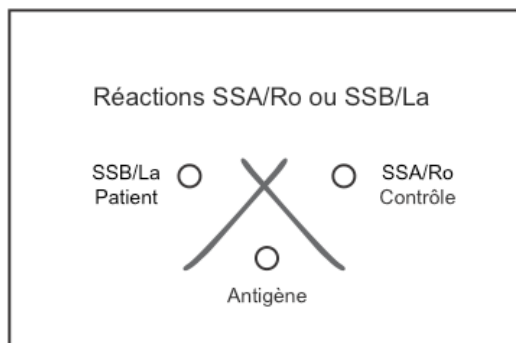


Un arc de précipitation se forme uniquement avec le sérum de contrôle. Les échantillons de patient qui ne forment pas d'arcs de précipitation sont notés comme étant négatifs.

## INTERPRÉTATION TECHNIQUE

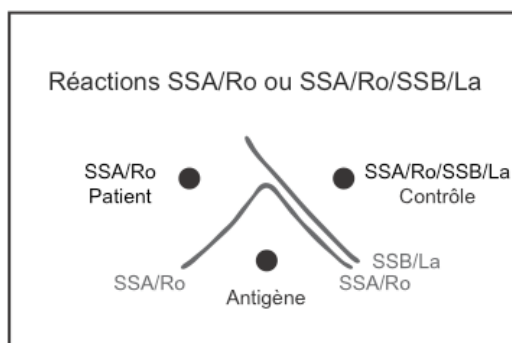
### SSA/Ro ou SSB/La

Les anticorps anti-SSA/Ro et SSB/La présentent généralement des arcs de précipitation qui se croisent, indiquant une non-identité. Les arcs de précipitation SSA/Ro sont généralement étroits et nets tandis que les arcs de précipitation SSB/La peuvent sembler plus larges et moins bien définis.



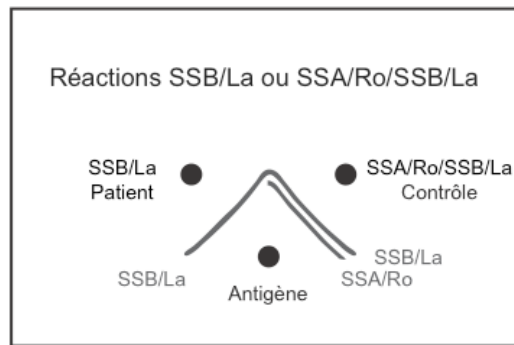
### SSA/Ro ou SSA/Ro/SSB/La

Les sérums monospécifiques pour les anticorps SSA/Ro se distinguent généralement des sérums qui contiennent des anticorps anti-SSA/Ro et SSB/La en évaluant les caractéristiques de précipitation et la réactivité par rapport aux sérums de contrôle. Les sérums ayant seulement des anticorps anti-SSA/Ro forment généralement un arc de précipitation étroit et net avec identité par rapport au contrôle SSA/Ro. Les sérums avec des anticorps anti-SSA/Ro et SSB/La présentent un arc de précipitation étroit avec identité par rapport au contrôle SSA/Ro et un arc de précipitation large qui montre l'identité par rapport au contrôle SSB/La. Dans certains sérums positifs aux anticorps SSA/Ro et SSB/La, les deux arcs de précipitation peuvent sembler présenter une fusion partielle.



### SSB/La ou SSA/Ro/SSB/La

La distinction entre les sérums monospécifiques pour les anticorps SSB/La et les sérums qui contiennent des anticorps SSA/Ro/SSB/La peut s'avérer difficile car l'arc de précipitation SSB/La est généralement plus large et moins bien défini que l'arc de précipitation SSA/Ro. Pour confirmer qu'un sérum contient à la fois des anticorps SSA/Ro et SSB/La, les deux arcs de précipitation doivent être clairement visibles. Généralement, on observe un arc de précipitation large présentant une identité par rapport au contrôle SSB/La et un arc de précipitation étroit présentant une identité par rapport au contrôle SSA/Ro. L'arc de précipitation SSA/Ro peut sembler fusionner partiellement avec l'arc de précipitation SSB/La. La dilution successive des sérums peut améliorer la distinction des deux arcs.



### 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.<sup>®</sup> 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.<sup>®</sup> 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

Immunospécificité 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 SSA/Ro/SSB/La AUTO I.D.<sup>®</sup> d'Immuno Concepts a été testé sur un total de 61 sérums de patient positifs et négatifs provenant de laboratoires de référence agréés (22). On a obtenu un agrément de 96,7% sur l'ensemble des sérums testés. Huit sérums étaient positifs aux anticorps SSB/La, un était positif aux anticorps SSA/Ro et SSB/La et trois étaient positifs aux anticorps SSA/Ro. Quinze sérums présentaient des « arcs de précipitation indéfinis » (UPL).

Lors des tests supplémentaires avec le système de test des auto-anticorps Sm/RNP AUTO I.D.<sup>®</sup> d'Immuno Concepts, douze de ces sérums étaient positifs aux anticorps RNP, deux étaient positifs aux anticorps Sm/RNP et un était positif aux anticorps Sm. 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 SSA/Ro et SSA/Ro/SSB/La. Ces sérums ont été de nouveau testés sur deux autres tests disponibles sur le marché et ont donné des arcs de précipitation peu clairs lorsqu'ils ont été comparés aux prototypes de contrôles SSA/Ro, SSB/La, Sm et U1-RNP (des lignes d'identité ou de non-identité claires n'ont pas pu être détectées).

**Précision:** Six sérums positifs aux anticorps SSA/Ro/SSB/La ont été testés en double à trois occasions. Dans tous les cas, tous les résultats ont présenté des spécificités d'anticorps identiques: cinq sérums étaient uniformément positifs aux anticorps SSA/Ro et SSB/La et un était uniformément positif aux anticorps SSB/La.

## BIBLIOGRAPHIE

- Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *Biol. Chem.* 245:10514 - 10522, 1979.
- Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M.J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochores) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:1627-1631, 1980.
- Cohen, M.L., Dawkins, B., Dawkins, R.L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
- 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.
- 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 Disease. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
- Alspaugh, M.A., Tan, E.M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073, 1975.
- Alspaugh, M.A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
- Wolfe, J.F., Adelstein, E., Sharp, G.C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
- Nishikai, M., Reichlin, M. Purification and Characterization of a Nuclear, Nonhistone Basic Protein (Mi-1) Which Reacts with Antiimmunoglobulin Sera and the Sera of Patients with Dermatomyositis. *Mol. Immunol.* 17:1129-1131, 1980.
- Alspaugh, M.A., Tan, E.M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 29:711-719, 1976.
- von Mühlen, C.A. and Tan, E.M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. *Sem. Arthritis Rheum.* 24:323-358, 1995.
- Holden, D.J., Brownell, A.K.W., and Fritzler, M.J. Clinical and Serologic Features of Patients with Polymyositis or Dermatomyositis. *Can. Med. Assoc. J.* 132:649-653, 1985.
- 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.
- Fritzler, M.J., Tan, E.M. Antinuclear Antibodies and the Connective Tissue Diseases. In: *Laboratory Diagnostic Procedures in the Rheumatic Diseases (Third Edition)*, Chapter 8, Grune and Stratton, 1985.
- Clark, G., Reichlin, M., and Tomasi, T.B. Characterization of a Soluble Cytoplasmic Antigen Reactive with Sera from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 102:117-122, 1969.
- Mattioli, M. and Reichlin, M. Heterogeneity of RNA Protein Antigens Reactive with Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 17:421-429, 1974.
- Sontheimer, R.D., Maddison, P.J., Reichlin, M., et al. Serologic and HLA Associations in Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus, a Clinical Subset of Lupus Erythematosus. *Ann. Intern. Med.* 97:664-671, 1982.
- Alexander, E.L., Arnett, F.C., Provost, T.T., et al. Sjögren's Syndrome: Association of Anti-Ro (SSA) Antibodies with Vasculitis, Hematologic Abnormalities, and Serologic Hyperreactivity. *Ann. Intern. Med.* 98:155-159, 1983.
- Provost, T.T., Arnett, F.C., and Reichlin, M. Homozygous C2 Deficiency, Lupus Erythematosus, and Anti-Ro (SSA) Antibodies. *Arthritis Rheum.* 26:1279-1282, 1983.
- Wasiczek, C.A. and Reichlin, M. Clinical and Serological Differences Between Systemic Lupus Erythematosus Patients with Antibodies to Ro versus Patients with Antibodies to Ro and La. *J. Clin. Invest.* 69:835-843, 1982.
- Maddison, P.J., Provost, T.T., and Reichlin, M. Serological Findings in Patients with "ANA Negative" Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine* 60:87-94, 1981.
- 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](mailto: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](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)