



AUTO I.D.[®] SISTEMA DI ANALISI DEGLI AUTOANTICORPI ANTI-Sm/RNP

**Per uso diagnostico in vitro
Per Uso Professionale**

USO PREVISTO: sistema di analisi ad immunodiffusione Ouchterlony per il rilevamento di autoanticorpi anti-Sm (Smith), anti-RNP (U1-Ribonucleoproteina) e di altri autoantigeni nel siero umano. I risultati di questo sistema di analisi possono essere di ausilio nella diagnosi del lupus eritematoso sistemico, della malattia mista la tessuto connettivo e di altre patologie reumatiche.

RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE

Le proteine cellulari solubili in soluzione fisiologica sono denominate ENA (Extractable Nuclear Antigens, antigeni nucleari estraibili). Gli anticorpi contro l'ENA sono stati associati a parecchie sindromi autoimmuni e sembrano avere un significato diagnostico e/o prognostico nella sclerosi sistemica progressiva (1, 2), nella malattia mista del tessuto connettivo (3-5), nella sindrome di Sjögren (6, 7), nella polimiosite (8), nel lupus eritematoso sistemico (5) e nell'artrite reumatoide (10). Tra le più comuni specificità anticorpo ci sono: Smith (Sm); Ribonucleoproteina (RNP o U1-RNP); SSA/Ro; SSB/La; Jo-1; Scl-70; e antigene nucleare delle cellule proliferanti (PCNA) (11). L'analisi degli anticorpi antinucleari (ANA) è stata usata come screening per questi anticorpi, ma l'ANA non indica la specificità dell'anticorpo e gli anticorpi contro alcuni ENA non mostrano un'analisi ANA positiva (12, 13). Quindi è altamente raccomandata un'analisi secondaria di conferma per gli anticorpi contro gli ENA (14).

L'antigene Sm fu identificato nel 1966 da Tan e Kunkel come soluzione fisiologica solubile, glicoproteina non istone non dipendente da DNA o RNA per la sua antigenicità (15). Gli anticorpi anti-Sm sono considerati come uno specifico marcatore sierologico grazie al loro elevato grado di specificità dell'SLE. Essi sono rilevati fino al 40% di pazienti con SLE e sono stati associati a malattia renale attiva e ad encefalite (16-19).

Anticorpi anti-Sm si trovano di frequente in connessione con gli anticorpi diretti contro il complesso U1-RNP nel siero di pazienti affetti da SLE (20, 21). A differenza degli anticorpi anti-Sm, gli anticorpi anti-RNP non sono considerati un marcatore sierologico specifico in quanto si trovano in pazienti con una serie di malattie reumatiche compresi SLE, sclerodermia, sindrome di Sjögren e artrite reumatoide. Comunque, anticorpi con alti titoli RNP sono altamente associati da soli ad una sindrome coincidente che è definita come malattia mista del tessuto connettivo o MCTD. I pazienti con MCTD tipicamente mostrano un insieme di caratteristiche cliniche rilevabili nell'SLE, nella sclerodermia e nella polimiosite. Questi pazienti spesso mostrano una buona risposta al trattamento corticosteroide ed hanno una minore incidenza di malattia renale in confronto ai pazienti affetti da SLE (21, 22).

PRINCIPIO DEL TEST

Sono disponibili parecchi saggi per il rilevamento di specifici anticorpi contro gli antigeni nucleari. I metodi più comunemente usati comprendono l'analisi mediante immunodiffusione di Ouchterlony, l'emoagglutinazione passiva, la controimmunolettroforesi e l'analisi ELISA (14). L'analisi mediante immunodiffusione di Ouchterlony (ID) è attualmente la più usata per la sua comodità e per la relativa facilità della performance e dell'interpretazione.

Il sistema di analisi degli autoanticorpi Sm/RNP AUTO I.D.[®] della Immuno Concepts per il rilevamento di anticorpi anti-Smith e anti-ribonucleoproteici utilizza la tecnica di analisi ad immunodiffusione di Ouchterlony. L'analisi impiega l'esclusivo preparato con antigene nucleare della Immuno Concepts contenente una serie di antigeni nucleari che reagiscono con gli anticorpi presenti in pazienti con malattie reumatiche sistemiche.

L'antigene nucleare è posto in un pozzetto centrale di una piastra di agarosio con sieri di controllo e campioni di siero del paziente posti nei sei pozzetti per campioni circostanti. Dopo l'incubazione a temperatura ambiente, si forma una linea di precipitazione nel gel di agarosio in cui l'antigene nucleare si diffonde e incontra l'anticorpo omologo. I sieri sono analizzati per la specificità antigene/anticorpo visualizzando le linee di precipitazione di identità o parziale identità tra i campioni del paziente e i sieri di controllo. I sieri che non producono linee di precipitazione sono considerati negativi. Anticorpi con diverse specificità possono produrre linee di non identità se confrontate coi sieri di controllo usati nel saggio.

COMPONENTI DEL SISTEMA - MATERIALI FORNITI

Uso: Tutti i sieri di controllo sono pronti per l'uso senza che sia necessaria ulteriore diluizione, suddivisione in aliquote o ricostituzione. L'antigene nucleare è liofilizzato e deve essere ricostituito con acqua distillata o deionizzata prima dell'uso.

Conservazione: Tutti i componenti possono essere conservati alla temperatura di 2-10°C. L'antigene nucleare ricostituito va usato entro 5 giorni o conservato congelato in aliquote a temperatura di -20°C o a una temperatura inferiore.

Stabilità: Tutti i sieri di controllo restano stabili per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Le piastre di agarosio sono stabili per almeno 24 mesi dalla data di produzione. L'antigene nucleare liofilizzato resta stabile per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Dopo la ricostituzione, l'antigene nucleare resta stabile per 5 giorni a 2-10°C, o per 90 giorni se congelato alla temperatura di -20°C o ad una temperatura inferiore. Per risultati migliori, conservare l'antigene ricostituito in aliquote da 30 µl ad una temperatura di -20°C o inferiore.

REAGENTI REATTIVI

Antigene nucleare AUTO I.D.® ANTIGEN: numero di catalogo 6050 (0,2 ml). Antigene nucleare liofilizzato estratto da mammiferi contenente Smith (Sm), U1-Ribonucleoproteina (RNP), SSA/Ro, SSB/La, ed altri antigeni che comunemente reagiscono con anticorpi di pazienti con malattie reumatiche sistemiche. Ogni fiala deve essere ricostituita con 200 µl di acqua distillata o deionizzata prima dell'uso.

Preparazione: rimuovere il cappuccio di metallo dalla fiala di antigene nucleare. Sollevare attentamente il tappo di gomma per aprire la fiala. Rimuovere il tappo e aggiungere alla fiala 200 µl di acqua distillata o deionizzata. Rimettere il tappo di gomma e agitare delicatamente per sciogliere il contenuto. Lasciar riposare l'antigene ricostituito per almeno 30 minuti prima dell'uso al fine di assicurare che lo stesso sia completamente sciolto. L'antigene ricostituito può apparire torbido o nebuloso. Mescolare immediatamente prima dell'uso.

Siero di controllo positivo Sm/RNP CONTROL|+: numero di catalogo 6002 (0,5 ml). Fiala pronta per l'uso contenente anticorpi umani reattivi con antigeni nucleari Smith (Sm) e U1-Ribonucleoproteina (RNP). Questo siero mostra forti linee di precipitazione di identità con sieri CDC di riferimento per questi antigeni.

Siero di controllo positivo RNP CONTROL|+: numero di catalogo 6001 (0,5 ml). Fiala pronta per l'uso contenente anticorpi umani reattivi con l'antigene nucleare U1-Ribonucleoproteina (RNP). Questo siero mostra forti linee di precipitazione di identità con il siero CDC di riferimento per questo antigene.

COMPONENTI NON REATTIVI

Piastre AUTO I.D.® PLATE: numero di catalogo 7010. Piastre di agarosio con sette pozzetti comprendenti dei pozzetti prenumerati per agevolare l'identificazione dei pazienti.

Preparazione: far raggiungere alle piastre la temperatura ambiente (18-25°C) prima di aprire il sacchetto di alluminio. Rimuovere attentamente la piastra dal sacchetto di alluminio. La condensa presente sulla parte interna del coperchio può essere eliminata con carta bibula o con carta assorbente priva di filacce. Evitare di toccare l'agarosio.

ULTERIORI MATERIALI NECESSARI - MA NON FORNITI

Pipette volumetriche per erogare volumi da 20 µl, 30 µl, 100 µl, e 200 µl

Provette

Acqua deionizzata o distillata

Tavolo luminoso per immunodiffusione e ingranditore

Guanti a perdere

COMPONENTI OPZIONALI DISPONIBILI

Nel caso si ottengano risultati con linee di precipitina positive non definite, sono disponibili ulteriori sieri di controllo per agevolare la determinazione della specificità dell'anticorpo.

Ripetere l'analisi con sieri di controllo appropriati pronti all'uso posti nei pozzetti adiacenti al campione del paziente ed interpretare seguendo le linee guida che si trovano nella sezione "Interpretazione generale".

Siero di controllo positivo SSA/Ro **CONTROL|+**: numero di catalogo 7001 (0,5 ml). Fiala pronta per l'uso contenente anticorpi umani reattivi con l'antigene nucleare SSA/Ro.

Siero di controllo positivo SSA/Ro/SSB/La **CONTROL|+**: numero di catalogo 7002 (0,5 ml). Fiala pronta per l'uso contenente anticorpi umani reattivi con gli antigeni nucleari SSA/Ro e SSB/La.

Siero di controllo positivo SSB/La **CONTROL|+**: numero di catalogo 7003 (0,5 ml). Fiala pronta per l'uso contenente anticorpi umani reattivi con l'antigene nucleare SSB/La.

Siero di controllo positivo Jo-1 **CONTROL|+**: numero di catalogo 6004 (0,5 ml). Fiala pronta per l'uso contenente anticorpi umani reattivi con l'antigene Jo-1.

Siero di controllo positivo Scl-70 **CONTROL|+**: numero di catalogo 6005 (0,5 ml). Fiala pronta per l'uso contenente anticorpi umani reattivi con l'antigene Scl-70.

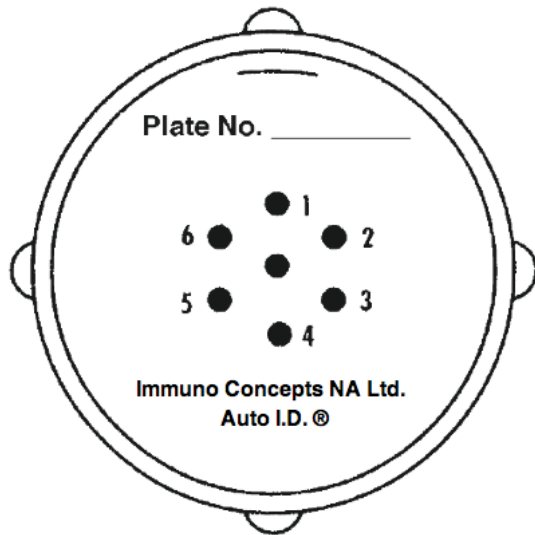
Siero di controllo positivo PCNA **CONTROL|+**: numero di catalogo 6006 (0,5 ml). Fiala pronta per l'uso contenente anticorpi umani reattivi con l'antigene nucleare delle cellule proliferanti (PCNA).

PRECAUZIONI

1. Tutti i materiali di origine umana usati per questo prodotto sono stati analizzati e trovati negativi (non ripetutamente reattivi) per gli anticorpi del virus dell'immunodeficienza umana tipo 1 (HIV-1), del virus della immunodeficienza umana tipo 2 (HIV-2), del virus dell'epatite C (HCV) e per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) con metodi approvati dalla FDA. Nessun metodo di analisi può garantire con completa sicurezza che siano assenti HIV-1, HIV-2, epatite C, epatite B o altri agenti infettivi. Quindi, tutti i materiali del kit vanno maneggiati secondo le stesse modalità utilizzate per materiale potenzialmente infettivo.
2. Il sodio azide (0,09%) viene usato come conservante. Quando si eliminano i reagenti, far scorrere grandi quantità di acqua del rubinetto per evitare la formazione di potenziali residui nelle tubature. Il sodio azide è un veleno e può essere tossico se ingerito.
3. Non congelare le piastre AUTO I.D.[®] Per assicurare risultati coerenti, riscaldare sempre le piastre a temperatura ambiente prima dell'uso.
4. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente l'antigene nucleare ricostituito.
5. Prima dell'uso, lasciar riposare l'antigene appena ricostituito per almeno 30 minuti a temperatura ambiente per assicurare che lo stesso sia completamente sciolto.
6. È accettabile la sostituzione di componenti di altri sistemi di analisi degli autoanticorpi AUTO I.D.[®] della Immuno Concepts. La sostituzione di componenti di altri produttori può dar luogo a risultati non coerenti.
7. Improvvisi cambi nella temperatura dell'aria possono causare la formazione di linee di precipitina artefatte. Per risultati migliori, incubare le piastre in un ambiente a temperatura controllata lontano da correnti d'aria. Non incubare a 37°C.
8. Alcuni sieri possono mostrare falsi risultati negativi a causa di un fenomeno di inibizione (eccesso di anticorpi). Se il fenomeno di inibizione è rilevante, ripetere l'analisi utilizzando diluizioni del siero del paziente in PBS.
9. Alcuni campioni di pazienti contenenti fosfolipidi possono formare ampie strisce di precipitina che circondano l'intero pozzetto del paziente. Questo non va interpretato come una reazione positiva.
10. Questo sistema di analisi è per uso diagnostico *in vitro*.

METODI DI ANALISI

L'analisi AUTO I.D.[®] può essere preparata per protocolli ad una fase e a due fasi per ottenere rispettivamente un tempo di sosta minimo o la massima economia. Di seguito sono descritte le linee guida raccomandate per predisporre un protocollo ottimale secondo le specifiche esigenze di ciascun laboratorio.



Screening in piccolo impianto/o test di conferma (Metodo 1)

- Pozzetto 1: paziente 1
- Pozzetto 2: controllo anticorpo monospecifico (RNP)
- Pozzetto 3: paziente 2
- Pozzetto 4: controllo anticorpo misto (Sm/RNP)
- Pozzetto 5: paziente 3
- Pozzetto 6: controllo anticorpo misto (Sm/RNP)
- Pozzetto centrale: antigene nucleare

Screening in grande impianto e/o titolazione (Metodo 2)

- Pozzetto 1: paziente 1
- Pozzetto 2: paziente 2
- Pozzetto 3: paziente 3
- Pozzetto 4: paziente 4
- Pozzetto 5: paziente 5
- Pozzetto 6: controllo anticorpo misto (Sm/RNP)
- Pozzetto centrale: antigene nucleare

I sieri di pazienti che mostrano linee di precipitina con il metodo 2 dopo 18-24 ore, vanno ulteriormente analizzati per la specificità seguendo il Metodo 1.

RACCOLTA DI CAMPIONI

Il siero deve essere raccolto con tecniche asettiche. Non appena possibile, il siero deve essere separato dal coagulo in modo da evitare l'emolisi. Non vanno usati sieri che mostrano un alto grado di emolisi, lipemia o crescita microbica. I sieri possono essere conservati a 2-10°C per 48 ore prima dell'uso. Se l'analisi viene ulteriormente rimandata, i sieri devono essere congelati ad una temperatura di -20°C o ad una temperatura inferiore.

RISULTATI INTERPRETAZIONE GENERALE

La giusta interpretazione dei risultati dei pazienti dipende dalla chiara risoluzione della linea di precipitina tra i pozzetti del siero del paziente e quelli dell'antigene nucleare. La determinazione della specificità dell'anticorpo dipende dalla giusta interpretazione delle linee di precipitina tra i pozzetti del siero del paziente e quelli di controllo adiacenti.

Le definizioni che seguono servono da linee guida di base per interpretare le reazioni tra sieri dei pazienti e sieri di controllo.



Linee di precipitina che formano una linea continua tra il siero del paziente e quello di controllo indicano che gli anticorpi in ciascun siero stanno reagendo con antigeni nucleari identici. Campioni dei pazienti che mostrano linee di precipitina di identità sono riportati come positivi con specificità degli anticorpi identica a quella del controllo.



Linee di precipitina intersecanti tra il siero del paziente e quello di controllo indicano che gli anticorpi in ciascun siero stanno reagendo con antigeni nucleari diversi.

Campioni che mostrano linee di precipitina di non identità sono riportati come positivi con reattività "linea di precipitina non definita" (UPL). Si raccomanda di eseguire altre analisi con altri controlli per stabilire la specificità dell'anticorpo (consultare "Componenti opzionali disponibili").



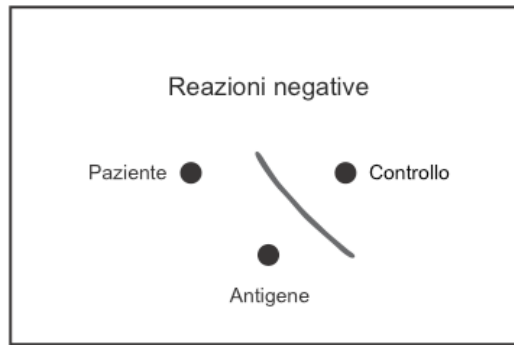
Linee di precipitina che formano uno "sperone" tra il pozzetto del paziente e quello di controllo indicano che gli anticorpi nel siero del paziente e in quello di controllo stanno reagendo con un antigene identico ma il siero del paziente contiene anche un anticorpo che reagisce con un antigene diverso non reagente col siero di controllo.

ATTENZIONE: le reazioni ad identità parziale sono le più difficili da interpretare. Spesso la linea di precipitina del controllo si curva in quella del paziente al punto di contatto. Osservare attentamente le linee di precipitina per assicurarsi che quella del paziente non si incroci con quella del controllo. Consultare la sezione "Interpretazione tecnica" per le reazioni di inibizione che possono causare una formazione a "sperone" tra sieri positivi anticorpo anti-Sm e anti-RNP adiacenti.



Linee di precipitina formanti una linea continua obliqua tra il paziente e il controllo indicano che ciascun siero sta reagendo con antigeni nucleari identici, ma il siero del paziente contiene più o meno anticorpi rispetto al controllo.

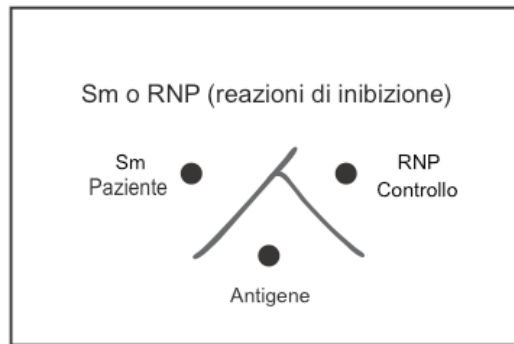
Campioni dei pazienti che mostrano linee di identità oblique sono riportati come positivi con specificità identica a quella del controllo.



Si forma una linea di precipitina solo col siero di controllo. I campioni del paziente non formanti linee di precipitina sono riportati come negativi.

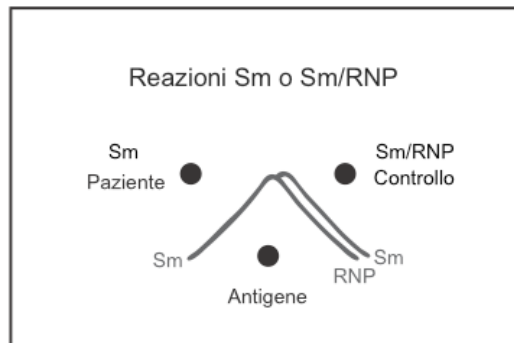
INTERPRETAZIONE TECNICA

Sm o RNP (reazioni ad inibizione)

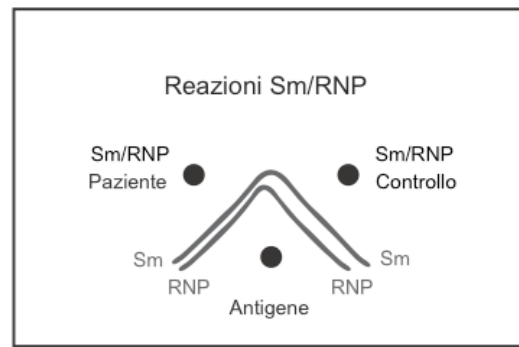
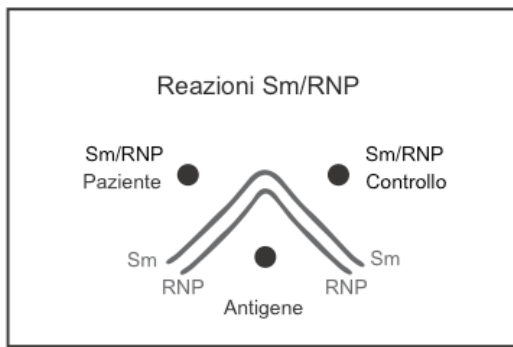


Una differenziazione tra un siero positivo anticorpo anti-Sm ed un siero positivo anticorpo anti-RNP in pozzetti adiacenti non è sempre indicata da una reazione di non-identità. I sieri positivi degli anticorpi anti-Sm adiacenti ai sieri di controllo degli anticorpi positivi anti-RNP possono spesso mostrare una reazione a “sperone” di parziale identità con RNP. Questa reazione viene interpretata in modo più appropriato come reazione di inibizione (23). Non si presenta una reazione di non identità perché l’anticorpo diretto contro l’RNP è inibito dall’incrocio della linea di precipitina Sm perché tutte le particelle dell’antigene RNP sono legate all’antigene Sm. L’antigene Sm può anche essere presente come molecola libera o nascente, che è responsabile della produzione di una reazione a “sperone”.

Sm o Sm/RNP

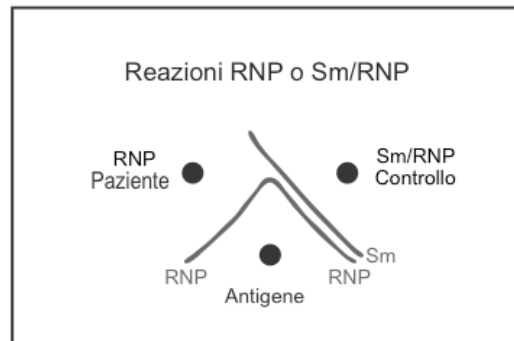


La differenziazione tra sieri positivi agli anticorpi anti-Sm e sieri di controllo positivi agli anticorpi anti-Sm/RNP adiacenti può essere difficile perché le particelle di antigene Sm sono presenti sia come particelle libere che come particelle legate all’antigene RNP. Di rado si vedono sieri positivi agli anticorpi anti-Sm monospecifici. Tuttavia, quando rilevati, essi mostrano di frequente una netta linea di precipitina di parziale identità con l’RNP ed una linea di precipitina di identità con l’Sm.



Più di frequente, i sieri positivi all'anticorpo anti-Sm contengono anche anticorpi anti-RNP. Questi sieri possono mostrare due linee di identità corrispondenti tra i controlli Sm/RNP. Più di frequente i sieri positivi agli anticorpi anti-Sm/RNP possono essere visti come una larga linea di precipitina in cui le due linee non hanno una risoluzione chiara. Una maggiore diluizione del siero può dare una risoluzione migliore.

RNP o Sm/RNP



Sieri positivi agli anticorpi anti-RNP monospecifici mostrano una chiara linea di precipitina di identità con RNP quando sono adiacenti ai sieri di controllo positivi agli anticorpi anti-Sm/RNP.

Titolazione

Per una determinazione semiquantitativa della quantità di anticorpi specifici presenti nei sieri positivi si possono usare diluizioni seriali duplici dei sieri del paziente. La titolazione può anche contribuire all'interpretazione delle reazioni che avvengono vicino al pozzetto dell'antigene nucleare nello screening iniziale dovute all'eccesso di anticorpi. Riportare il titolo come l'elemento reciproco dell'ultima diluizione che mostra chiare linee di precipitina di identità con i sieri di controllo.

LIMITAZIONI

1. Sebbene un risultato positivo possa essere indicativo di una malattia reumatica sistemica, ciò non va considerato come diagnostico ma esaminato piuttosto come parte del complessivo profilo clinico del paziente.
2. I sistemi di analisi AUTO I.D.[®] della Immuno Concepts sono ottimizzati per la rilevazione della maggioranza di pazienti con autoanticorpi anti-Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, Jo-1 e antigeni PCNA. Occasionali campioni con livelli di anticorpi molto alti o molto bassi possono dare falsi risultati negativi in qualunque sistema di analisi ad immunodiffusione con tecnica Ouchterlony. La diluizione di campioni in PBS o concentrazione di anticorpo riempiendo in modo doppio o triplo i pozzetti del paziente può migliorare il rilevamento di anticorpi in questi campioni.
3. L'antigene nucleare AUTO I.D.[®] della Immuno Concepts comprende un insieme di autoantigeni di mammiferi. Quindi i sieri dei pazienti possono mostrare linee di precipitina con antigeni che non mostrano reazioni di identità con i sieri di controllo inclusi in questo sistema di analisi. Tali sieri devono essere rianalizzati con sieri di controllo ad altre specificità di antigene (consultare "Componenti opzionali disponibili").

VALORI ATTESI

Immunospecificità degli anticorpi agli antigeni nucleari (dati da riferimento bibliografico 14)	
Anticorpi diretti contro:	Associazione con patologie:
Sm	SLE: 25-40%; anticorpo marcatore
RNP nucleare (U1-RNP)	MCTD: 95-100%; minore frequenza in SLE, lupus discoide, PSS
SSA/Ro	Sindrome di Sjögren: 60-70%; SLE: 30-40%; sindrome lupus neonatale: 100%
SSB/La	Sindrome di Sjögren: 50-60%; SLE: 10-20%
PCNA	SLE: 10%; anticorpo marcatore
ScI-70	PSS: 15-20%; anticorpo marcatore
Jo-1	Polimiosite: 31%; anticorpo marcatore
PM-ScI (PM-1)	Polimiosite/Scleroderma coincidenti: 64%;

Abbreviations: SLE = lupus eritematoso sistemico, MCTD = malattia mista del tessuto connettivo, PSS = sclerosi sistemica progressiva, Sm = antigene Smith, PCNA = antigene nucleare di cellule proliferante.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Rilevamento: Il sistema di analisi degli autoanticorpi anti-Sm/RNP AUTO I.D.[®] della Immuno Concepts fu testato con un totale di 61 sieri di pazienti negativi e positivi ottenuti da qualificati laboratori di riferimento (24). Ci fu un accordo del 96,7% con tutti i sieri testati. Dodici sieri erano positivi per gli anticorpi anti-RNP, due sieri erano positivi per gli anticorpi anti-Sm/RNP ed un siero era positivo per gli anticorpi anti-Sm. Dodici sieri mostrarono "linee di precipitina non definite" (UPL). Ulteriori test con il sistema di analisi degli autoanticorpi anti-SSA/Ro/SSB/La AUTO I.D.[®] della Immuno Concepts mostrarono otto sieri positivi per gli anticorpi SSB/La, un siero positivo per gli anticorpi SSA/Ro e SSB/La e tre sieri positivi per gli anticorpi SSA/Ro. Trentadue sieri erano negativi per qualunque autoanticorpo contro gli antigeni nucleari rilevabili. I due sieri discrepanti furono originariamente riportati come positivi rispettivamente per gli anticorpi anti-Sm e anti-Sm/RNP. Questi sieri furono ulteriormente testati in triplicato con un'altra analisi disponibile sul mercato e trovati negativi per qualunque autoanticorpo contro gli antigeni nucleari rilevabili.

Precisione: sei sieri positivi per anticorpi anti-Sm o anti-RNP furono testati in duplicato in tre occasioni. In ogni caso, tutti i risultati delle analisi mostrarono identiche specificità anticorpo: tre sieri erano uniformemente positivi per gli anticorpi anti-Sm e anti-RNP, due sieri erano uniformemente positivi per gli anticorpi anti-RNP ed un siero era uniformemente positivo per gli anticorpi anti-RNP con un'altra linea di precipitina non definita.

RIFERIMENTI

- 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.
- Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M.J., et al. Autoantibodies 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, 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.
- Alspaugh, M.A., and Tan, E.M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1078, 1975.
- 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.
- Wolfe, J.F., Adelstein, J.F., and Sharp, G.C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
- 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.
- 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.
- 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. 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.
- 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.
- 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.
- Nakamura, R.M. and Tan, E.M. Autoantibodies to Nonhistone Nuclear Antigens and Their Clinical Significance. *Hum. Pathol.* 14:392-400, 1983.
- 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.
- 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.
- Conner, G.E., Nelson, D., Wisniewski, 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.
- Notman, D.D., Kurata, N., and Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Intern. Med.* 83:464-469, 1975.
- Tan, E.M. Antinuclear Antibodies in Diagnosis and Management. *Hosp. Pract.* 18:78-84, 1983.

In caso di danni all'imballaggio protettivo, contattare Immuno Concepts prima dell'uso.



Fornitore



Rappresentante autorizzato
nella Comunità Europea



Limitazione Di
Temperatura



Contiene sufficiente per <n> test



Leggere le
istruzioni per l'uso



Dispositivo Medico Diagnostico 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-It

Rev 3.0 © Copyright 2014

PROCEDURA DI ANALISI IN AUTO-I.D.®

1. RICOSTITUZIONE DELL'ANTIGENE NUCLEARE

Ricostituire la fiala di antigene nucleare aggiungendo 200 µl di acqua distillata o deionizzata. Lasciar riposare la fiala ricostituita per almeno 30 minuti a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso per assicurare che l'antigene sia completamente sciolto. Mescolare delicatamente prima dell'uso.

NOTA: l'antigene ricostituito può apparire torbido o nebuloso. Per risultati ottimali, conservare l'antigene ricostituito in aliquote da 30 µl ad una temperatura di -20°C o inferiore. Prima dell'uso far raggiungere all'antigene la temperatura ambiente.

2. PREPARAZIONE DELLE PIASTRE AUTO I.D.®

Far raggiungere alle piastre la temperatura ambiente (18-25°C) prima di aprire il sacchetto di alluminio. Rimuovere con cura la piastra dal sacchetto di alluminio. La condensa presente sulla parte interna del coperchio può essere eliminata con carta bibula o con carta assorbente priva di filacce. Evitare di toccare l'agarosio.

3. PREPARAZIONE DEL MODULO DI PROTOCOLLO AUTO I.D.®

Registrare il numero della piastra, controllare la specificità col numero di pozzetto e l'identificazione del paziente col numero di pozzetto per ciascun campione da analizzare. Registrare sul modulo di protocollo AUTO I.D.® anche il numero di lotto del sistema di analisi degli autoanticorpi AUTO I.D.® in uso.

4. DILUIZIONE DEI CAMPIONI DEI PAZIENTI (OPZIONALE)

La diluizione dei campioni di siero dei pazienti può essere necessaria per la titolazione o se si osserva un fenomeno di inibizione (eccesso di anticorpi). Preparare le diluizioni dei campioni di pazienti con soluzione salina tamponata al fosfato (PBS). Diluire il campione del paziente a 1:2 aggiungendo 100 µl di campione del paziente non diluito a 100 µl di PBS. Per continuare la titolazione fare diluizioni seriali duplici del campione di siero (ad es., 1:2, 1:4, 1:8 ... 1:64) usando PBS.

5. RIEMPIMENTO DEI POZZETTI

Mettere 20 µl di antigene nucleare nel pozzetto centrale della piastra AUTO I.D.®. Mettere 20 µl di campione del paziente o di siero di controllo nei pozzetti numerati seguendo uno dei formati raccomandati, descritti in "Metodi di analisi". Rimettere il coperchio.

6. DOPPIO RIEMPIMENTO DEI CAMPIONI DEI PAZIENTI (OPZIONALE)

Occasionali campioni con livelli di anticorpi molto bassi possono dare risultati deboli o falsi risultati negativi in qualunque sistema di analisi ad immunodiffusione con tecnica Ouchterlony. La concentrazione di anticorpi riempiendo in modo doppio o triplo i pozzetti del paziente può migliorare il rilevamento in questi campioni. È possibile ottenere la concentrazione dei campioni riempiendo di nuovo il pozzetto del paziente con altri 20 µl di siero dopo circa 30 minuti.

7. INCUBAZIONE DELLE PIASTRE

Mettere con cura le piastre riempite in un piccolo contenitore in modo da proteggerle dalle correnti d'aria ed incubarle a temperatura ambiente (18-25°C) per 18-24 ore. Non incubare a 37°C.

ATTENZIONE: correnti d'aria e improvvisi cambi nella temperatura dell'aria possono causare la formazione di linee di precipitina artefatte. Per risultati migliori, incubare le piastre in un ambiente a temperatura controllata.

8. LETTURA DELLE PIASTRE

Dopo 18-24 ore, osservare le piastre su una tavola luminosa con un ingranditore. Per le linee guida raccomandate per la lettura delle linee di precipitina, consultare la sezione "Interpretazione".

NOTA: per la maggior parte dei sieri i risultati saranno visibili entro 18 ore. Con alcuni sieri a titolo basso linee di precipitina più distinte sono osservabili dopo 24 e 48 ore.

PER ASSISTENZA TECNICA: +1-916-363-2649

o a mezzo di e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com