



SISTEMA DE TESTE AUTO I.D.[®] DE AUTOANTICORPO PARA Sm/RNP

Para uso em diagnóstico in vitro
Para uso profissional

USO PRETENDIDO: Este é um sistema de teste de imunodifusão de Ouchterlony para detecção de autoanticorpo para Sm (Smith), RNP (Ribonucleoproteína U1) e outros autoantígenos em soro humano. Os resultados deste sistema de teste podem ser usados para ajudar a diagnosticar lúpus eritematoso sistêmico, doença mista do tecido conectivo ou outras doenças reumáticas.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

As proteínas celulares solúveis em solução salina são chamadas antígenos nucleares extraíveis ou ENA. Os anticorpos para ENA foram associados a várias síndromes autoimunes e parecem ter significância diagnóstica e/ou prognóstica em esclerose sistêmica (1, 2), doença mista do tecido conectivo (3-5), síndrome de Sjögren (6, 7), polimiosite (8), dermatomiosite (9), lúpus eritematoso sistêmico (5) e artrite reumatoide (10). Algumas das especificidades mais comuns do anticorpo incluem: Smith (Sm); Ribonucleoproteína (RNP ou U1-RNP); SSA/Ro; SSB/La; Jo-1; Scl-70 e antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) (11). O teste de anticorpo antinuclear (ANA) foi usado como triagem para esses anticorpos, mas o ANA não indica a especificidade do anticorpo, e os anticorpos para alguns ENA não produzem teste ANA positivo (12, 13). Assim, os testes confirmatórios secundários para anticorpos para ENA são altamente recomendados (14).

O antígeno Sm foi identificado em 1966, por Tan e Kunkel, como uma glicoproteína não-histona solúvel em solução salina, que não é dependente de DNA ou RNA para sua antigenicidade (15). Os anticorpos para Sm são considerados um marcador sorológico específico devido a seu alto grau de especificidade para LES. São encontrados em até 40% dos pacientes com LES e foram associados a doença renal ativa e cerebrite (16-19).

Os anticorpos para Sm são encontrados com frequência em conjunto com anticorpos para U1-RNP no soro de pacientes com LES (20, 21). Ao contrário dos anticorpos para Sm, os anticorpos para RNP não são considerados um marcador sorológico específico, porque são encontrados em pacientes com diversas doenças reumáticas, inclusive LES, esclerodermia, síndrome de Sjögren e artrite reumatoide. Contudo, os altos títulos de anticorpos para RNP isolados são grandemente associados a uma síndrome de sobreposição denominada doença mista do tecido conectivo, ou DMTC. Os pacientes com DMTC apresentam classicamente uma combinação de características clínicas encontradas em LES, esclerodermia e polimiosite. Esses pacientes apresentam também, com frequência, boa resposta ao tratamento com corticosteroides e têm incidência menor de doença renal em comparação com os pacientes com LES (21, 22).

PRINCÍPIO DO TESTE

Existem diversos ensaios para a detecção de anticorpos específicos para antígenos nucleares. Os mais usados são imunodifusão de Ouchterlony, hemaglutinação passiva, contra-immunoeletroforese e ELISA (14). O método de imunodifusão (ID) de Ouchterlony é, no momento, o ensaio mais usado devido à conveniência e à relativa facilidade de execução e interpretação.

O Sistema de teste AUTO I.D.[®] para autoanticorpo para Sm/RNP da Immuno Concepts para detecção de anticorpos para antígenos nucleares Smith e Ribonucleoproteína U1 emprega a técnica de imunodifusão de Ouchterlony . O teste utiliza a preparação exclusiva de antígeno nuclear da Immuno Concepts, que contém uma variedade de antígenos nucleares que reagem com anticorpos encontrados nos pacientes com doença reumática sistêmica. O antígeno nuclear é colocado em um poço central de uma placa de agarose com amostras de soro de controle e de soro do paciente e, logo após, colocado nos seis poços de amostra circundantes. Depois da incubação em temperatura ambiente, forma-se uma linha de precipitação no gel agarose no qual o antígeno nuclear se difunde e encontra o anticorpo homólogo. O soro é testado quanto à especificidade para antígeno/anticorpo, verificando-se linhas de precipitação de identidade ou identidade parcial entre as amostras de soro de controle e do paciente. O soro que não produz linhas de precipitação é considerado negativo. Os anticorpos com diferentes especificidades podem produzir linhas de não-identidade quando comparados com o soro de controle usado no ensaio.

COMPONENTES DO SISTEMA - MATERIAIS FORNECIDOS

Uso: Todas as amostras de soro de controle vêm prontas para usar sem necessidade de diluir, compor alíquotas ou de reconstituição. O antígeno nuclear vem liofilizado e deve ser reconstituído com água destilada ou desionizada antes de usar.

Armazenamento: Todos os componentes podem ser armazenados em refrigeração de 2 °C a 10 °C. O antígeno nuclear reconstituído deve ser usado dentro de 5 dias ou armazenado em alíquotas congeladas a -20 °C ou menos.

Estabilidade: Todas as amostras de soro de controle são estáveis por pelo menos 12 meses a partir da data de fabricação. As placas de agarose são estáveis por 24 meses a partir da data de fabricação. O antígeno nuclear liofilizado é estável por pelo menos 12 meses, a partir da data de fabricação. Depois da reconstituição, o antígeno nuclear é estável por 5 dias de 2 °C a 10 °C, ou por 90 dias congelado a -20 °C ou menos. Para obter melhores resultados, armazenar o antígeno reconstituído em alíquotas de 30 µl a -20 °C ou menos.

REAGENTES REATIVOS

Antígeno nuclear AUTO I.D.[®] [ANTIGEN]: No. Cat. 6050 (0,2 ml). Antígeno nuclear liofilizado extraído de mamíferos que contém Smith (Sm), Ribonucleoproteína U1 (RNP), SSA/Ro, SSB/La e outros antígenos que normalmente reagem com anticorpos dos pacientes que têm doença reumática sistêmica. Cada frasco deve ser reconstituído com 200 µl de água destilada ou desionizada antes de usar.

Preparação: Remover o lacre de metal do frasco de antígeno nuclear. Levantar cuidadosamente a tampa de borracha do frasco para liberar o ar. Remover a tampa e adicionar 200 µl de água destilada ou desionizada ao frasco. Recolocar a tampa de borracha e agitar suavemente para dissolver o conteúdo. Deixar o antígeno reconstituído descansar pelo menos 30 minutos antes de usar para garantir que o antígeno esteja completamente dissolvido. O antígeno reconstituído pode parecer turvo ou escuro. Agitar imediatamente antes de usar.

Soro de controle positivo para Sm/RNP [CONTROL +]: N° Cat. 6002 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígenos nucleares Smith (Sm) e Ribonucleoproteína U1 (RNP). Este soro apresenta fortes linhas de precipitação de identidade para os soros de referência dos CDC para esses antígenos.

Soro de controle positivo para RNP [CONTROL +]: N° Cat. 6001 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígeno nuclear Ribonucleoproteína U1 (RNP). Este soro apresenta uma única linha de precipitação forte de identidade para o soro de referência dos CDC para esse antígeno.

COMPONENTES NÃO-REATIVOS

Placas de AUTO I.D.[®] [PLATE]: N° Cat. 7010. Placas para agarose com sete poços pré-numerados para garantir a fácil identificação dos pacientes.

Preparação: Deixar a placa atingir a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes de abrir a bolsa de papel alumínio. Remover cuidadosamente a placa da bolsa de papel alumínio. A condensação presente na tampa interna da placa pode ser removida com papel absorvente ou papel-toalha livre de felpas. Evitar o contato com a agarose.

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS - PORÉM NÃO FORNECIDOS

Pipetas volumétricas para dispensar volumes de 20 µl, 30 µl, 100 µl e 200 µl
Tubos de ensaio
Água desionizada e destilada
Negatoscópio de imunodifusão e ampliador
Luvas descartáveis

COMPONENTES OPCIONAIS DISPONÍVEIS

Caso se obtenham resultados positivos com linha de precipitina indefinida, existem soros de controle adicionais para auxiliar a determinação da especificidade do anticorpo. Repetir o teste com soro de controle pronto para usar colocado nos poços adjacentes à amostra do paciente e interpretar de acordo com as diretrizes da seção “Interpretação geral”.

Soro de controle positivo para SSA/Ro **CONTROL|+**: N° Cat. 7001 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígeno nuclear SSA/Ro.

Soro de controle positivo para SSA/Ro/SSB/La **CONTROL|+**: N° Cat. 7002 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígenos nucleares SSA/Ro e SSB/La.

Soro de controle positivo para SSB/La **CONTROL|+**: N° Cat. 7003 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígeno nuclear SSB/La.

Soro de controle positivo para Jo-1 **CONTROL|+**: N° Cat. 6004 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígeno Jo-1.

Soro de controle positivo para Scl-70 **CONTROL|+**: N° Cat. 6005 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígeno nuclear Scl-70.

Soro de controle positivo para PCNA **CONTROL|+**: N° Cat. 6006 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígeno nuclear com antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA).

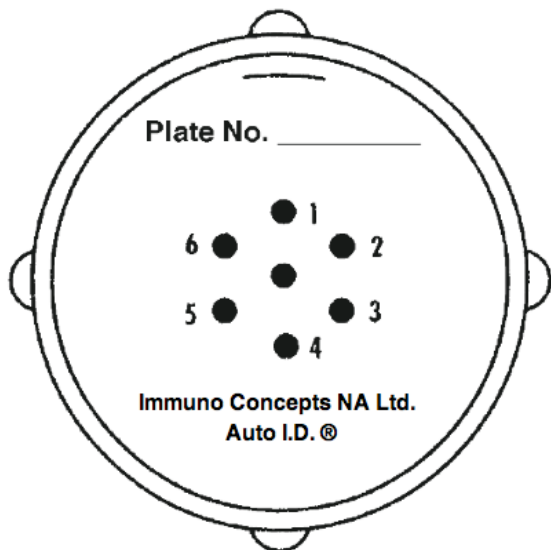
PRECAUÇÕES

1. Todos os materiais de origem humana usados neste produto foram testados e foram negativos (não-reativos repetidamente) para anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1), vírus da imunodeficiência humana-2 (HIV-2), vírus da hepatite C (HCV) e para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), segundo métodos aprovados pela FDA. Contudo, nenhum método de teste pode oferecer garantia total de que HIV-1, HIV-2, hepatite C, hepatite B ou outros agentes infecciosos estejam ausentes. Assim, todos os materiais do kit devem ser manuseados da mesma maneira que materiais com potencial infeccioso.
2. A azida sódica (0,09%) é usada como conservante. Ao descartar os reagentes, enxaguar com grandes volumes de água corrente para evitar possíveis resíduos no encanamento. A azida sódica é um veneno e pode ser tóxica quando ingerida.
3. Não congele as placas AUTO I.D.®. Para garantir resultados uniformes, sempre aquecer as placas até a temperatura ambiente antes de usar.
4. Evitar o congelamento e descongelamento repetitivo do antígeno nuclear reconstituído.
5. Sempre deixar que o antígeno nuclear recém-reconstituído descanse por pelo menos 30 minutos em temperatura ambiente antes de usar para ter certeza de que antígeno foi completamente dissolvido.
6. A substituição de componentes de outros Sistemas de teste de autoanticorpo AUTO I.D.® da Immuno Concepts é aceitável. A substituição de componentes de outros fabricantes pode gerar resultados incompatíveis.
7. As alterações súbitas da temperatura do ar podem causar a formação de artefato de linhas de precipitina. Para obter os melhores resultados, incubar as placas em ambiente com temperatura controlada, longe das correntes de ar. Não incubar a 37 °C.
8. Alguns soros podem apresentar resultados falso-negativos devido ao fenômeno pró-zona (excesso de anticorpo). Se o fenômeno pró-zona for uma preocupação, repetir o teste usando diluições de soro do paciente em PBS.

9. Algumas amostras de soro dos pacientes, que contêm fosfolipídeos, formam faixas largas de precipitação que circundam todo o poço da amostra do paciente. Isso não deve ser interpretado como reação positiva.
10. Este sistema de teste destina-se ao uso para diagnóstico *in vitro*.

MÉTODOS DE TESTE

O teste AUTO I.D.[®] pode ser definido em protocolos de uma etapa e de duas etapas para atingir o mínimo tempo de processo ou a economia máxima, respectivamente. O que segue são recomendações gerais para auxiliar a definição do protocolo ideal para cada requisito específico do laboratório.



Teste de seleção e/ou confirmação de volume (Método 1)

- Poço 1 - Paciente 1
- Poço 2 - Controle de anticorpo monoespecífico (RNP)
- Poço 3 - Paciente 2
- Poço 4 - Controle de anticorpo misto (Sm/RNP)
- Poço 5 - Paciente 3
- Poço 6 - Controle de anticorpo misto (Sm/RNP)
- Poço do centro - Antígeno nuclear

Seleção e/ou titulação de alto volume (Método 2)

- Poço 1 - Paciente 1
- Poço 2 - Paciente 2
- Poço 3 - Paciente 3
- Poço 4 - Paciente 4
- Poço 5 - Paciente 5
- Poço 6 - Controle de anticorpo misto (Sm/RNP)
- Poço do centro - Antígeno nuclear

As amostras de soro dos pacientes que apresentam linhas de precipitina pelo Método 2 depois de 18 a 24 horas, devem ser testadas novamente quanto à especificidade, segundo o Método 1.

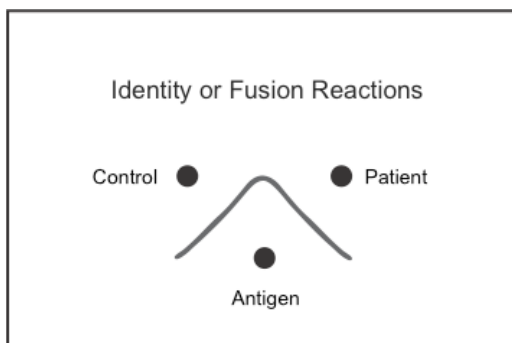
COLETA DE AMOSTRA

O soro deve ser coletado por técnica asséptica. O soro deve ser separado do coágulo por centrifugação, assim que possível para evitar a hemólise. As amostras de soro que apresentarem alto grau de hemólise, lipemia ou crescimento microbiano não devem ser usadas. O soro pode ser armazenado de 2 °C a 10 °C por até 48 horas antes de usar. Se os testes demorarem mais que isso, o soro deve ser armazenado e congelado a -20 °C ou menos.

RESULTADOS – INTERPRETAÇÃO GERAL

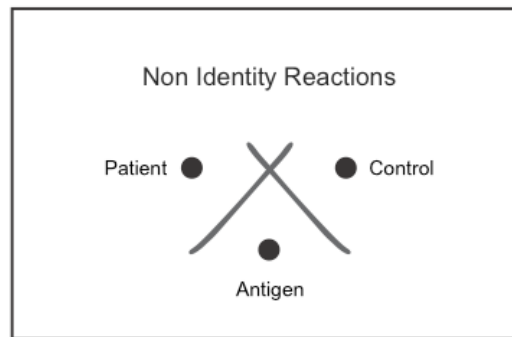
A interpretação adequada dos resultados do paciente depende da resolução nítida da linha de precipitina entre os poços de soro do paciente e de antígeno nuclear. A determinação da especificidade do anticorpo do paciente depende da interpretação apropriada das linhas de precipitina entre os poços de soro do paciente e de controle adjacente.

As seguintes definições devem servir como diretriz básica para a interpretação de reações entre o soro do paciente e o de controle.



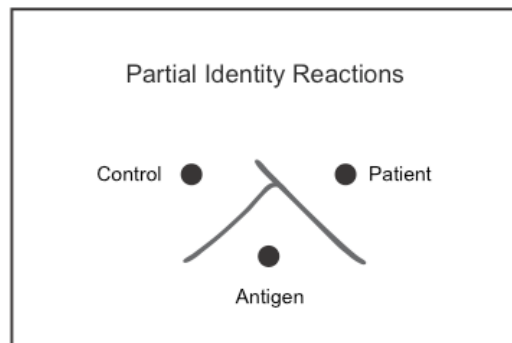
As linhas de precipitina que formam uma linha contínua entre o soro do paciente e o de controle indicam que os anticorpos em cada soro estão reagindo com antígenos nucleares idênticos.

As amostras de pacientes que apresentam linhas de precipitina de identidade são relatadas como positivas com especificidade de anticorpo idêntica à do controle.



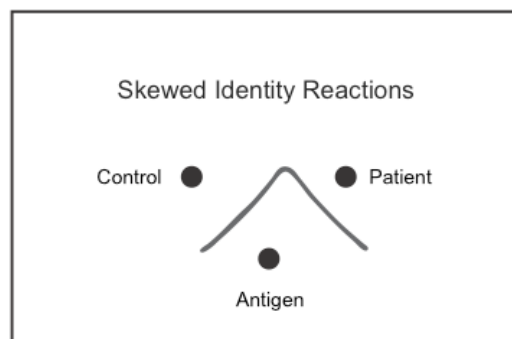
As linhas de precipitina que não cruzam entre o soro do paciente e o de controle indicam que os anticorpos em cada soro estão reagindo com antígenos nucleares diferentes.

As amostras que apresentem linhas de precipitina são relatadas como positivas com reatividade de "linha de precipitina indefinida" (UPL). Recomenda-se realizar mais testes com outros controles para determinar a especificidade do anticorpo (Ver "Componentes ideais disponíveis").



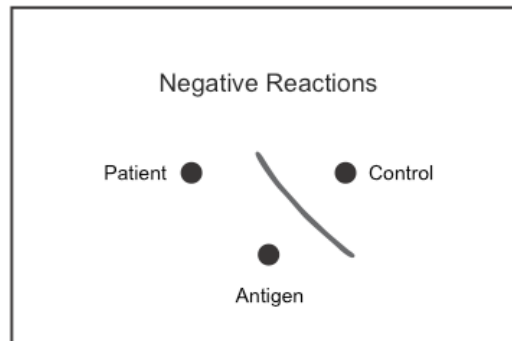
As linhas de precipitina que formam uma "projeção" entre o poço de soro do paciente e o de soro de controle indicam que os anticorpos do paciente e do controle estão reagindo com antígeno idêntico, mas que o soro do paciente também contém um anticorpo que reage com um antígeno diferente que não reage com o soro de controle.

CUIDADO: As reações parciais de identidade são as mais difíceis de interpretar. Com frequência, a linha de precipitina do controle curva-se para dentro da linha de precipitina do paciente no ponto de contato. Observar meticulosamente as linhas de precipitina para ter certeza de que a linha de precipitina do paciente não cruze a linha de precipitina do controle. Ver reações de inibição que podem causar a formação de "projeção" entre soros positivos para os anticorpos Sm e RNP adjacentes na seção "Interpretação técnica".



As linhas de precipitina que formam uma linha contínua distorcida entre o soro do paciente e o de controle indicam que o soro está reagindo com antígenos nucleares idênticos, mas que o soro do paciente contém mais ou menos anticorpos que o de controle.

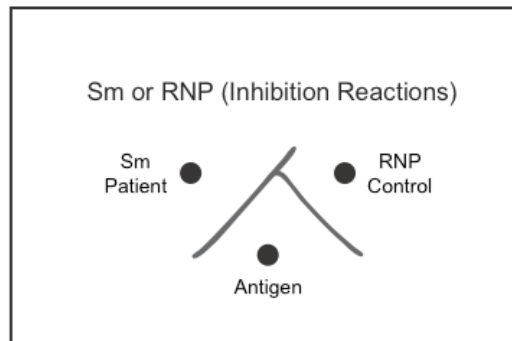
As amostras de pacientes que apresentam linhas de identidade distorcidas são relatadas como positivas para especificidade idêntica à do controle.



A linha de precipitina forma-se apenas com o soro de controle. As amostras do paciente que não formam linhas de precipitina são relatadas como negativas.

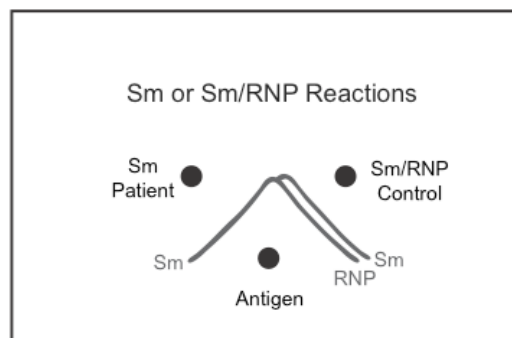
INTERPRETAÇÃO TÉCNICA

Sm ou RNP (Reações de inibição)

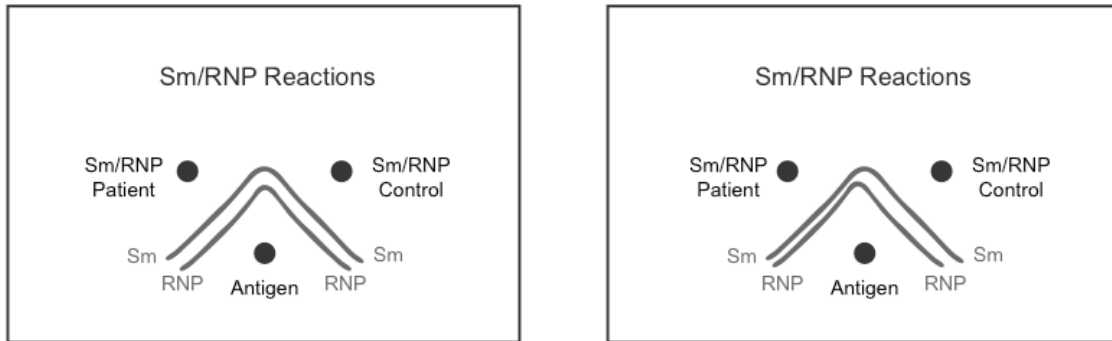


A diferenciação entre um soro positivo para o anticorpo para Sm e RNP nos poços adjacentes nem sempre é indicada por uma reação de não-identidade. As amostras de soro positivo para o anticorpo para Sm adjacentes aos soros de controle positivo para o anticorpo para RNP podem, com frequência, demonstrar uma reação com “projeção” de identidade parcial para RNP. Essa reação é interpretada de modo mais adequado como reação de inibição (23). A reação de não-identidade não ocorre porque o anticorpo para RNP é impedido de cruzar a linha de precipitina de Sm, porque todas as partículas de antígeno RNP formam complexo com o antígeno Sm. O antígeno Sm também pode estar presente como molécula livre ou nascente, que é responsável pela produção da reação com “projeção”.

Sm ou Sm/RNP

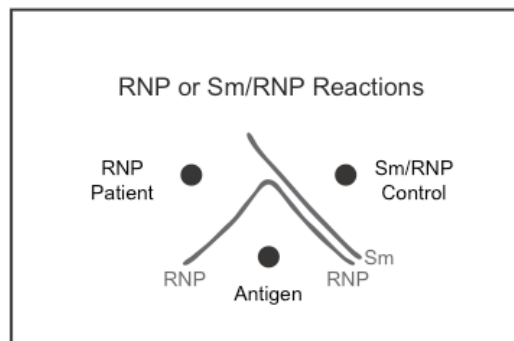


A diferenciação entre soros positivos para o anticorpo para Sm e os soros de controle positivos para o anticorpo para Sm/RNP pode ser difícil porque as partículas do antígeno Sm estão presentes como partículas livres e em complexo com o antígeno RNP. Os soros positivos para o anticorpo mono específico para Sm são raros. Contudo, quando encontrados, via de regra demonstram linha de precipitina nítida de identidade parcial para RNP e linha de precipitina de identidade para Sm.



Com mais frequência, o soro positivo para anticorpos para Sm também contém anticorpos para RNP. Esses soros podem apresentar duas linhas correspondentes de identidade entre os controles de Sm/RNP. Mais frequentemente, o soro positivo para o anticorpo para Sm/RNP pode ser visível como uma linha de precipitina larga, na qual as duas linhas não têm boa resolução. A maior diluição do soro pode proporcionar melhor resolução.

RNP ou Sm/RNP



Os soros positivos para anticorpo mono específico para RNP demonstram uma nítida linha de precipitina de identidade para RNP quando estão adjacentes aos soros de controle positivos para anticorpo para Sm/RNP.

Titulação

Duas diluições em série do soro do paciente podem ser usadas para fornecer uma determinação semiquantitativa da quantidade do anticorpo específico presente nos soros positivos. A titulação também pode auxiliar a interpretação de reações que ocorrem próximo do poço de antígeno nuclear na seleção inicial, devido ao excesso de anticorpo. Relatar o título como recíproca da última diluição que mostra linhas de precipitina nítidas de identidade para soros de controle.

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. Embora o resultado positivo possa ser sugestivo de doença reumática sistêmica, não deve ser considerado diagnóstico, mas sim, visto como uma parte do perfil clínico geral do paciente.
2. Os sistemas de teste AUTO I.D.[®] da Immuno Concepts são otimizados para detectar a maioria dos pacientes com autoanticorpo para os antígenos Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, Jo-1 e PCNA. As amostras ocasionais com níveis muito altos ou muito baixos de anticorpos podem gerar resultados falso-negativos em qualquer sistema de teste de imunodifusão de Ouchterlony. A diluição das amostras em PBS ou a concentração do anticorpo por enchimento duplo ou triplo dos poços de amostra do paciente podem ampliar a detecção de anticorpo nessas amostras.
3. O antígeno nuclear AUTO I.D.[®] da Immuno Concepts inclui uma mescla de autoantígenos de mamíferos. Assim, o soro dos pacientes pode apresentar linhas de preceptiva com antígenos que não mostram reações de identidade com o soro de controle incluído neste sistema de teste. Esses soros devem ser novamente testados com soro de controle quanto à especificidade para outros antígenos (Ver "Componentes ideais disponíveis").

VALORES ESPERADOS

Imunoespecificidade de autoanticorpos para antígenos nucleares (Dados da referência 14)	
Anticorpos para:	Associação com doenças:
Sm	LES: 25-40%; anticorpo marcador
RNP nuclear (U1-RNP)	DMTC: 95-100%; menor frequência no LES, lúpus discóide, ESP
SSA/Ro	Síndrome de Sjögren: 60-70%; LES: 30-40%; síndrome do lúpus neonatal: 100%
SSB/La	Síndrome de Sjögren: 50-60%; LES: 10-20%
PCNA	LES: 10%; anticorpo marcador
Scl-70	ESP: 15%-20%; anticorpo marcador
Jo-1	Polimiosite: 31%; anticorpo marcador
PM-Scl (PM-1)	Sobreposição polimiosite/esclerodermia: 64%;

Abreviações: LES = lúpus eritematoso sistêmico, DMTC = doença mista do tecido conectivo, ESP = esclerose sistêmica progressiva, Sm = antígeno Smith, PCNA = antígeno nuclear de célula proliferante.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Detecção: O Sistema de teste AUTO I.D.[®] para autoanticorpo para Sm/RNP da Immuno Concepts foi testado com um total de 61 amostras positivas e negativas de soro de paciente, obtidas de laboratórios de referência qualificados (24). Houve 96,7% de concordância em todos os soros testados. Doze soros foram positivos para anticorpos para RNP, dois soros foram positivos para anticorpos para Sm/RNP e um soro foi positivo para anticorpos para Sm. Doze soros apresentaram “linhas de precipitina indefinidas” (UPLs). Outros testes com o Sistema de teste AUTO I.D.[®] de autoanticorpo para SSA/Ro/SSB/La da Immuno Concepts mostraram oito soros positivos para anticorpos para SSB/La, um soro positivo para anticorpos para SSA/Ro e SSB/La e três soros positivos para anticorpos para SSA/Ro. Trinta e dois soros foram negativos para qualquer anticorpo detectável para antígenos nucleares. Os dois soros discrepantes foram originalmente relatados como positivos para anticorpo para Sm e Sm/RNP, respectivamente. Esses soros foram testados pela terceira vez em outro teste encontrado no comércio e foram negativos para qualquer anticorpo detectável para antígenos nucleares.

Precisão: Seis soros positivos para anticorpos para Sm ou RNP foram testados em duplicata em três ocasiões. Em todos os casos, todos os resultados do teste mostraram especificidades idênticas do anticorpo: três soros foram uniformemente positivos para anticorpos para Sm e RNP; dois soros foram uniformemente positivos para anticorpos para RNP e um soro foi uniformemente positivo para anticorpos para RNP com outra linha de precipitina indefinida.

BIBLIOGRAFIA

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., Fritzler, M.J., et al. Autoantibodies to Centromere (Kinetochores) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1627-1631, 1980.
3. Cohen, M.L., Dawkins, B., Dawkins, R.L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
4. Sharp, G.C., Irwin, W.S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52:148-159, 1972.
5. Sharp, G.C., Irwin, W.S., Tan, E.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., Fritzler, 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. 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.
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.

Em caso de dano na embalagem protetora, entre em contato com a Immuno Concepts antes de usar.



Fabricante



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Limitação de temperatura



Contém o suficiente para <n> testes



Consultar Instruções de uso



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
Assistência Técnica EUA: 1.800.251.5115 Fora dos EUA: 1.916.363.2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 6000-I,

4.11.02.003.096-Pt

Rev 3.0 © Copyright 2014

AUTO-I. D.[®] - PROCEDIMENTO DO TESTE

1. RECONSTITUIÇÃO DE ANTÍGENO NUCLEAR

Reconstituir o frasco de antígeno nuclear adicionando 200 µl de água destilada ou desionizada. Deixar o frasco reconstituído descansar pelo menos 30 minutos em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes de usar para garantir que o antígeno esteja completamente dissolvido. Agitar suavemente antes de usar.

NOTA: O antígeno reconstituído pode parecer turvo ou escuro. Para ter melhores resultados, armazenar o antígeno reconstituído em alíquotas de 30 µl a -20 °C ou menos. Deixar o antígeno atingir a temperatura ambiente antes de usar.

2. PREPARAÇÃO DA(S) PLACA(S) DO AUTO I.D.[®]

Deixar a placa atingir a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes de abrir a bolsa de papel alumínio. Remover cuidadosamente a placa da bolsa de papel alumínio. A condensação presente na tampa interna da placa pode ser removida com papel absorvente ou papel-toalha livre de felpas. Evitar o contato com a agarose.

3. PREPARAÇÃO DA PLANILHA DO AUTO I.D.[®]

Registrar o número da placa a especificidade do controle por número do poço e identificação do pacientes por número do poço para cada amostra a ser testada. Registrar também o número do lote do Sistema de teste de autoanticorpo AUTO I.D.[®] que estiver sendo usado na planilha do AUTO I.D.[®].

4. DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DO PACIENTE (OPCIONAL)

As diluições das amostras de soro dos pacientes podem ser desejáveis para titulação ou quando se observa um fenômeno pró-zona (excesso de anticorpo). Preparar diluições das amostras do paciente com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Diluir a amostra até 1:2 adicionando 100 µl de amostra não diluída do paciente a 100 µl de PBS. Para continuar a titulação, fazer duas diluições em série da amostra de soro (por exemplo, 1:2, 1:4, 1:8 ... 1:64), usando PBS.

5. ENCHIMENTO DOS POÇOS

Colocar 20 µl de antígeno nuclear no centro do poço da placa DO AUTO I.D.[®]. Colocar 20 µl da amostra do paciente ou do soro de controle nos poços numerados, seguindo um dos formatos descritos em "Métodos de teste." Recolocar a tampa.

6. ENCHIMENTO COM DUPLA AMOSTRA DE PACIENTES (OPCIONAL)

As amostras ocasionais com níveis muito baixos de anticorpos podem gerar resultados muito fracos ou falso-negativos em qualquer sistema de teste de imunodifusão de Ouchterlony. A concentração do anticorpo fazendo-se enchimento duplo ou triplo dos poços de amostra do paciente pode ampliar a detecção nessas amostras. A concentração das amostras pode ser atingida reenchendo-se o poço de amostra do paciente com mais 20 µl de soro depois de cerca de 30 minutos.

7. INCUBAÇÃO DAS PLACAS

Colocar cuidadosamente as placas cheias em uma pequena caixa para protegê-las de correntes de ar e incubá-las em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) por 18 a 24 horas. Não incubar a 37 °C.

CUIDADO: As correntes de ar e as alterações abruptas da temperatura do ar podem causar a formação de artefatos de linhas de precipitina. Para obter os melhores resultados, incubar as placas em ambiente com temperatura controlada.

8. LEITURA DAS PLACAS

Ver as placas em um negatoscópio com ampliador depois de 18 a 24 horas. Consultar as diretrizes recomendadas para leitura das linhas de precipitina na seção "Interpretação".

NOTA: Para a maioria dos soros, os resultados devem ser visíveis dentro de 18 horas. Com alguns soros de título baixo, as linhas de precipitina mais distintas podem ser vistas em 24 e 48 horas.

PARA ASSISTÊNCIA TÉCNICA:

EUA: 1-800-251-5115 Fora dos EUA: 1-916-363-2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

