

SCREENING DEGLI ENA CON POZZETTO SINGOLO RELISA® PER ANTICORPI DIRETTI CONTRO GLI ANTIGENI NUCLEARI ESTRAIBILI

Per uso diagnostico in vitro

Per Uso Professionale

Numero di catalogo: 7096-10 (96 pozzetti) e 7696-10 (576 pozzetti)

USO PREVISTO: sistema di analisi a dosaggio immunoenzimatico (EIA) per la determinazione nel siero umano di anticorpi diretti contro gli antigeni nucleari estraibili Sm (Smith), RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, e Jo-1. I risultati di questa analisi possono essere usati come aiuto nella diagnosi delle autoimmunopatie.

RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE

Gli anticorpi contro gli ENA (Extractable nuclear antigens, antigeni nucleari estraibili) 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), nella dermatomiosite (9), nel lupus eritematoso sistemico (5) e nell'artrite reumatoide (10). Il test ANA (Antinuclear antibody, anticorpi antinucleari) è stato usato come screening per questi anticorpi, ma l'ANA non indica la specificità dell'anticorpo e gli anticorpi contro alcuni ENA non mostrano test ANA positivi (11, 12). Quindi è altamente raccomandata un'analisi secondaria di conferma per gli anticorpi contro gli ENA (13).

L'antigene Sm (Smith) 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 (14). Gli anticorpi anti-antigeni Sm sono considerati come uno specifico marcatore sierologico grazie al loro elevato grado di specificità per l'SLE (Systemic Lupus Erythematosus, lupus eritematoso sistemico). I livelli osservati di questi anticorpi che sono stati associati a malattia renale attiva e ad encefalite raggiungono fino al 30% dei pazienti (15-17).

Gli 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 (18, 19). A differenza degli anticorpi anti-antigene 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, elevati livelli di anticorpi diretti contro l'RNP sono altamente associati ad una sindrome coincidente denominata MCTD (Mixed Connective Tissue Disease, malattia mista del tessuto connettivo). I pazienti con MCTD tipicamente mostrano un insieme di caratteristiche cliniche osservabili 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 (20, 21).

SSA e SSB furono originariamente descritti come antigeni nucleari RNA-proteina nei pazienti con sindrome di Sjögren (6, 7). Ro e La furono descritti come antigeni citoplasmatici RNA-proteina nei pazienti con SLE (22, 23). È ora comunemente accettato che SSA e Ro siano analoghi, SSB e La siano analoghi e che questi antigeni si trovino nel nucleo e nel citoplasma. Anticorpi diretti verso l'SSA/Ro soltanto o l'SSA/Ro e l'SSB/La sono stati rilevati nel 62% di pazienti con lupus cutaneo subacuto (24), e nell'85% di pazienti con sindrome di Sjögren che sviluppano vasculite (25). Anticorpi diretti solamente verso l'SSA/Ro si presentano nei pazienti che hanno una deficienza a livello omozigotico della frazione del complemento C2 (26), nei pazienti con cirrosi biliare primaria che sviluppano la sindrome di Sjögren (27) e nei due terzi di pazienti con "SLE ANA negativo" (28).

L'autoantigene SSA/Ro è un complesso formato dalle proteine Ro60 e Ro52 e da piccole ribonucleoproteine. Questo complesso viene a volte denominato "complesso SSA/Ro hY-RNA" ed include la proteina SSB/La. La proteina Ro60 è strettamente associata al complesso SSA/Ro hY-RNA mentre la proteina Ro52 è associata debolmente a questo complesso (29).

L'antigene Scl-70 è stato identificato come enzima cellulare, topoisomerasi I del DNA (30). Anticorpi anti-Scl-70 sono stati segnalati nel 56% dei pazienti con sclerosi progressiva sistemica, ed in particolare nel sottogruppo di pazienti con sclerodermia diffusa (31). Questi anticorpi sono considerati come un marcatore per PSS, poiché non sono osservati in altre patologie del tessuto connettivo.

Anticorpi anti-Jo-1, che è l'istidil tRNA sintetasi dell'enzima cellulare, sono presenti nel 25-30% dei pazienti con polimiosite o dermatomiosite, ma non con altre miopatie (11, 32). È stato anche dimostrato che gli anticorpi diretti contro Jo-1 sono fortemente associati all'enfisema interstiziale osservato in connessione con la miosite (32).

PRINCIPIO DEL TEST

Questa analisi è un EIA (Enzime Immunoassay, dosaggio immunoenzimatico) qualitativo indiretto. In questo sistema, la superficie dei micropozzetti è stata rivestita con una miscela stabilizzata di antigeni nucleari estraibili purificati per affinità che funge da substrato antigenico. Le diluizioni dei campioni del paziente sono messe nei micropozzetti ed incubate lasciando reagire gli specifici anticorpi presenti nel campione con l'antigene in fase solida. Dopo il lavaggio per rimuovere l'anticorpo non legato e le altre proteine del siero, i pozzetti sono incubati con anticorpi anti-umani di capra etichettati con perossidasi di rafano. Il preparato di anticorpo coniugato con perossidasi di rafano incluso in questo sistema di analisi è specifico per catene umane IgG pesanti e leggere.

Se i risultati sono positivi, dopo l'incubazione col coniugato di perossidasi di rafano si forma un complesso stabile in tre parti. Questo complesso consiste di anticorpo anti-umano coniugato con perossidasi di rafano legante l'anticorpo anti-ENA umano che è legato all'antigene stabilizzato sulla superficie di plastica.

Dopo un'altra fase di lavaggio, questo complesso viene rilevato aggiungendo una soluzione di tetrametilbenzidina (TMB) e H₂O₂ come substrato cromogenico. Il grado di viraggio del colore in ciascun pozzetto è proporzionale alla concentrazione di anticorpi anti-ENA in ciascun campione di siero. Ciascun micropozzetto viene letto usando uno spettrofotometro a 450 nm.

COMPONENTI DEL SISTEMA - MATERIALI FORNITI

Conservazione: tutti i componenti vanno conservati alla temperatura di 2-10°C. Non congelare.

Stabilità: tutti i componenti restano stabili per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Non usare alcun componente oltre la data di scadenza.

REAGENTI REATTIVI

Strisce di micropozzetti rivestiti di antigene nucleare estraibile **PLATE:** numero di catalogo 7008-10. Piastra con dodici strisce da otto pozzetti ciascuna rivestiti con una miscela di sette antigeni nucleari estraibili, stabilizzati e purificati per affinità (Sm, RNP, SSA/Ro60, Ro/52, SSB/La, Scl-70 e Jo-1). Queste strisce sono di colore marrone codificato. Se per l'analisi sono necessari meno di otto pozzetti, questi possono essere separati staccandoli. Le strisce non utilizzate possono essere rimesse nel sacchetto con essicante provvisto di un'apposita chiusura a zip per sigillarlo e refrigerate fino a 45 giorni.

Diluyente del campione **SOLN|DIL:** numero di catalogo 7100 (100 ml). Esclusivo diluyente tamponato per campioni utilizzato per la diluizione dei campioni dei pazienti.

Reagente enzimatico degli anticorpi (specifico per catene anti-IgG umane pesante e leggera) **CONJ|HRP:** numero di catalogo 7009-10 (14 ml). Anti-IgG umane (H&L) coniugate con perossidasi di rafano (HRP). Il reagente è pronto per l'uso.

Soluzione di substrato **SOLN|SUB**   : numero di catalogo 7035 (14 ml). Soluzione di substrato enzimatica HRP-specifica, contenente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) stabilizzata e perossido di idrogeno (H₂O₂). Il reagente è pronto per l'uso. **PERICOLO**: Infiammabile. Questo reagente contiene meno del 25% di metanolo e acetone. Tenere fuori dalla portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

Reagente bloccante **SOLN|STOP**   : numero di catalogo 7033 (14 ml). Esclusivo reagente bloccante per sistemi di analisi EIA della Immuno Concepts. Il reagente è pronto per l'uso. **PERICOLO**: Corrosivo. Questo reagente contiene acidi cloridrico e solforico (meno del 3% ciascuno in volume), e deve essere maneggiato con cura. Tenere fuori dalla portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente con acqua abbondante e consultare un medico. Non aggiungere mai acqua a questo reagente.

Siero di calibrazione ENA **CAL**: numero di catalogo 7026-10 (2 ml). Siero umano contenente anticorpi diretti contro uno o più degli antigeni nucleari estraibili Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 e/o Jo-1. Il valore del dosaggio per questo siero è indicato sull'etichetta della fiala. Questo siero è alla diluizione operativa ed è pronto per l'uso.

Controllo positivo ENA **CONTROL|+**: numero di catalogo 7021-10 (2 ml). Siero di controllo positivo umano contenente anticorpi diretti contro uno o più degli antigeni nucleari estraibili Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 e/o Jo-1. Questo siero è alla diluizione operativa ed è pronto per l'uso.

Controllo negativo ENA **CONTROL|-**: numero di catalogo 7031 (2 ml). Siero di controllo umano negativo che non contiene anticorpi diretti contro gli antigeni Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 o Jo-1. Questo siero è alla diluizione operativa ed è pronto per l'uso.

Controllo positivo non diluito ENA (opzionale) **OPT+**: numero di catalogo 7022-10 (0,5 ml). Siero di controllo positivo umano contenente anticorpi diretti contro uno o più degli antigeni nucleari estraibili Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 e/o Jo-1. Trattare questo controllo positivo come un siero non diluito.

COMPONENTI NON REATTIVI

Supporto per micropozzetti

Soluzione tampone di lavaggio:

Tampone PBS **PWDR|PBS**: numero di catalogo 1011. Polvere salina tamponata al fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Ciascuna busta contiene polvere tamponata sufficiente a fare 1 litro. (Nei kit per analisi completi, per ogni piastra con 96 micropozzetti sono forniti due sacchetti di polvere tamponata).

Concentrato tampone di lavaggio **SOLN|WASH**: numero di catalogo 1031 (10 ml). Soluzione al 5% di Tween 20 da usare nel tampone di lavaggio. (Nei kit per analisi completi, per ogni piastra con 96 micropozzetti sono fornite due fiale di concentrato tamponato).

Preparazione: sciogliere il contenuto di una busta di tampone in un litro di acqua deionizzata o distillata. Aggiungere l'intero contenuto di un flacone di concentrato di tampone di lavaggio al PBS sciolto. Mescolare bene e tenere alla di 2-25°C fino a 4 settimane o fino a che non si presentino segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili. Prima dell'uso, la soluzione tampone di lavaggio deve essere a temperatura ambiente (18-25°C).

ALTRI MATERIALI NECESSARI - MA NON FORNITI

Pipette volumetriche di precisione per l'erogazione di volumi da 25-1000 µl
Flacone morbido per erogare la soluzione tampone di lavaggio nei micropozzetti o un sistema di lavaggio automatico o semiautomatico per micropozzetti
Contenitore da un litro per soluzione tampone di lavaggio PBS
Acqua deionizzata o distillata
Spettrofotometro per la lettura della piastra, capace di rilevare la misurazione dell'assorbanza a 450 nm
Provette per preparare le diluizioni dei sieri
Carta bibula o assorbente
Pipettatrice multicanale in grado di erogare i volumi necessari in 8 pozzetti
Guanti a perdere
Timer da laboratorio

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 componenti del kit vanno maneggiati secondo le stesse modalità utilizzate per i materiali potenzialmente infettivi.
2. Tutti i sieri di controllo, i seri di calibrazione e i campioni dei pazienti devono essere maneggiati osservando le precauzioni di sicurezza biologica di livello 2, come raccomandato per ogni siero umano potenzialmente infettivo o per campioni di sangue nel manuale pubblicato per i CDC/NIHM (Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, Centri per il Controllo delle Infezioni/Istituti Nazionali per la Sanità): *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Il sodio azide (0,09%) viene usato come conservante nei sieri di controllo e di calibrazione. Il sodio azide può reagire con le tubature in piombo o rame formando azoturi metallici altamente esplosivi. 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.
4. La diluizione di componenti o la sostituzione di componenti diversi da quelli forniti in questo sistema può dare risultati non coerenti.
5. Non inattivare a caldo i campioni di siero da usare il test di screening degli ENA RELISA®. L'inattivazione a caldo può causare l'aumento dei valori.
6. Questo kit è per uso diagnostico *in vitro*.
7. Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la cute e le mucose. In caso di contatto, lavare abbondantemente con un sapone germicida e acqua.
8. Non fumare, non mangiare o non bere nelle aree in cui sono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
9. Evitare sempre gli spruzzi e la formazione di aerosol.
10. Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli specificati possono dare risultati errati.
11. La contaminazione incrociata dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi. Durante l'analisi i campioni devono rimanere confinati nei micropozzetti.
12. Prima dell'uso, la vetreria di laboratorio riutilizzabile deve essere lavata e sciacquata a fondo e completamente liberata da ogni residuo di detergente. Prima dell'uso, tutta la vetreria di laboratorio deve essere pulita e asciutta.
13. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti, i pozzetti e i campioni a temperatura ambiente (18-25°C).
14. Indossare guanti a perdere quando si maneggiano campioni e reagenti e dopo lavare accuratamente le mani.
15. La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
16. Il reagente bloccante è corrosivo e può causare ustioni. Questo reagente contiene acidi cloridrico e solforico (meno del 3% ciascuno in volume), e deve essere maneggiato con cura. Tenere fuori della portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente con acqua abbondante e consultare un medico. Non aggiungere mai acqua a questo reagente.

RACCOLTA DI CAMPIONI

Raccolta: il siero è il campione preferito. Devono essere prelevati con tecnica asettica circa 5 ml di sangue intero per venopuntura usando una provetta di raccolta sterile a vuoto o un altro sistema di raccolta adatto. Lasciare che il sangue si coaguli a temperatura ambiente (18-25°C). Non appena possibile, il siero deve essere separato dal coagulo per centrifugazione in modo da minimizzare l'emolisi.

ATTENZIONE: *non inattivare a caldo i campioni di siero da usare il test di screening degli ENA RELISA®. L'inattivazione a caldo può causare l'aumento dei valori.*

Sostanze interferenti: non vanno usati sieri che mostrano un alto grado di emolisi, ittero, lipemia o crescita microbica, perché queste condizioni possono provocare risultati atipici. Campioni contenenti sostanze particellari visibili vanno chiariti per centrifugazione prima dell'analisi.

Conservazione: i sieri possono essere conservati a 2-10°C fino ad una settimana. Se l'analisi viene ulteriormente rimandata, i sieri devono essere conservati congelati a -20°C o a una temperatura inferiore. Il siero non deve essere conservato in frigoriferi autosbrinanti o in freezer.

ATTENZIONE: il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni dei pazienti può dare origine a falsi risultati positivi o a falsi risultati negativi.

NOTE PROCEDURALI GENERALI

1. Prima dell'uso è estremamente importante avere tutti i componenti del kit e i campioni di siero a temperatura ambiente (18-25°C). Per portare alla temperatura di 20°C un intero litro di tampone di lavaggio dopo averlo tolto dal frigo, possono essere necessarie parecchie ore. Temperature di incubazione superiori o inferiori al range stabilito possono essere causa di risultati non accurati. Dopo l'uso conservare al freddo campioni e reagenti non usati.
2. Mescolare bene i reagenti prima dell'uso capovolgendoli con delicatezza. Non far vorticare i reagenti e non scuoterli. Evitare la formazione di schiuma.
3. Quando si preparano le diluizioni dei campioni, le punte delle pipette devono essere asciugate prima di erogare il siero nel diluente per campioni. L'eccesso di campione adeso alla parte esterna della punta della pipetta influenza i risultati.
4. Si consiglia l'uso di una pipettatrice multicanale perché garantisce erogazione, tempi di incubazione e tempi di reazione più uniformi.
5. **Un adeguato lavaggio dei pozzetti è estremamente importante.** Pozzetti non lavati adeguatamente mostreranno valori di fondo alti e possono dare falsi valori positivi. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, poi riempirne ciascuno con soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti, particolarmente nel primo lavaggio dopo l'aspirazione. Drenare tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e di drenaggio per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere passati con forza su carta assorbente o altro materiale assorbente in modo da eliminare ogni traccia di residuo di tampone di lavaggio. L'uso di un sistema di lavaggio automatico dei micropozzetti ne assicurerà il giusto lavaggio ed è consigliato.
NOTA: a causa dei vari tipi di tecniche di lavaggio e di sistemi automatici, il numero dei lavaggi può essere adeguato in modo da ottenere risultati ottimali. Ciascun laboratorio deve decidere il numero di lavaggi più efficace per il proprio sistema di lavaggio.
6. Una inadeguata rimozione dei residui del tampone di lavaggio può causare un viraggio incoerente del colore. Per ridurre al minimo i residui di tampone di lavaggio, le strisce di micropozzetti devono essere tamponate su carta assorbente.
7. I tempi di tutte le fasi sono cruciali. Tutti i campioni di siero devono essere diluiti prima di iniziare la procedura e devono essere distribuiti nei micropozzetti nel minor tempo possibile (non più di cinque minuti). Le dimensioni dei lotti vanno fissate in modo che la manipolazione del campione possa essere realizzata comodamente entro questo lasso di tempo. L'uso di una pipetta multicanale agevola il maneggiamento dei campioni e dei reagenti ed è consigliato.
8. Con la sola eccezione dell'ultima incubazione (soluzione di substrato), ogni periodo di incubazione inizia con il completamento dell'erogazione del campione o del reagente. L'incubazione della soluzione di substrato deve durare esattamente 30 minuti per ciascun pozzetto. Tutti i campioni e i reagenti devono essere distribuiti con la stessa sequenza e a tasso costante.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

CALCOLI

1. Sottrarre il valore di assorbanza per il pozzetto bianco del reagente dai valori di assorbanza ottenuti nei pozzetti di calibrazione, di controllo e dei campioni del paziente. Calcolare i valori di assorbanza medi per i pozzetti in duplicato.
2. Per ottenere il fattore di conversione, la specifica concentrazione di anticorpi del siero di calibrazione (indicata sull'etichetta) si divide per il valore medio di assorbanza dei pozzetti di calibrazione.
3. Per ottenere la specifica concentrazione di anticorpi in unità, moltiplicare i valori di assorbanza di ciascuno dei campioni per il fattore di conversione.
4. La forma semplificata di questi calcoli può essere espressa come:

$$\frac{U_c \times \lambda_s}{\lambda_c} = U_s$$

U_c = Valore di calibrazione (unità)

λ_c = Assorbanza del calibratore*

λ_s = Assorbanza del campione*

U_s = Valore unitario per campione

*Se i calibratori e i campioni sono elaborati in duplicato, usare l'assorbanza media dei pozzetti in duplicato.

CONTROLLO DELLA QUALITÀ

1. Il valore di assorbanza medio dei pozzetti di calibrazione deve essere almeno di 0,400. Valori di assorbanza inferiori a 0,400 indicano un viraggio inadeguato del colore ed una sequenza non valida. Il viraggio inadeguato del colore in genere è dovuto all'uso di reagenti freddi o ad un tempo non esatto di una o più fasi dell'analisi. Portare i reagenti a temperatura ambiente (18-25°C), e ripetere la fase prestando particolare attenzione al tempo di tutte le fasi.
2. Il pozzetto di controllo del bianco deve avere un valore di assorbanza inferiore a 0,150. Valori di assorbanza del bianco superiori a 0,150 indicano un lavaggio inadeguato o contaminazione dei reagenti.
3. I campioni con valori di anticorpi maggiori del limite superiore del calibratore devono essere refertati come positivi e i valori verranno denominati come "maggiore di" oppure "uguale a" rispetto al valore indicato sull'etichetta del calibratore.
4. Il fattore di conversione deve essere calcolato per ogni sequenza. L'uso di un fattore di conversione di un'altra sequenza invalida i risultati.
5. Ciascun laboratorio deve stabilire e conservare i propri valori del range di riferimento (normali) sulla base del gruppo di pazienti e di altri fattori locali.
6. Il siero di controllo positivo è un siero umano contenente anticorpi diretti contro uno o più antigeni nucleari estraibili Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, e/or Jo-1. Questo è un controllo qualitativo che deve dare un valore superiore alle 20 unità ENA.
7. Il siero di controllo negativo è un pool di siero umano che non contiene gli anticorpi diretti contro uno dei sei autoantigeni di questa analisi. Questo è un controllo qualitativo che deve dare un valore inferiore alle 20 unità ENA.
8. Il siero di controllo positivo non diluito è un siero umano contenente anticorpi diretti contro uno o più degli antigeni nucleari estraibili Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 e/o Jo-1. Questo controllo deve dare un valore superiore a 20 Unità ENA.
9. Se un valore di controllo è fuori range, l'analisi non è valida e deve essere ripetuta.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL PAZIENTE

1. Questa è un'analisi qualitativa. I livelli di anticorpi rilevati non hanno alcun significato clinico noto e i valori delle unità ottenuti in questa analisi tendono semplicemente a dividere i pazienti nei tre ampi gruppi che seguono. I pozzetti di campione del paziente che hanno valori calcolati superiori o uguali a 25 unità ENA sono considerati positivi, e devono essere testati per singole specificità ENA. I pozzetti di campioni di pazienti che hanno valori calcolati inferiori a 20 unità ENA sono considerati negativi. Valori tra 20 e 25 unità sono considerati al limite della positività e devono essere ripetuti oppure testati per singole specificità ENA. Ciascun laboratorio deve fissare il proprio range di riferimento e i propri valori di cut-off sulla base dei gruppi di pazienti oggetto del test. I valori delle unità sono influenzati da fattori inerenti ai pazienti, da situazioni meccaniche (come ad esempio, la precisione e l'accuratezza della pipettatura) e dalle condizioni di analisi (come ad esempio, la temperatura e il tempo delle fasi).
2. Dal momento che il test di screening con provetta singola ENA RELISA[®] contiene una miscela di antigeni, i risultati rappresentano un insieme di reazioni di anticorpi a ciascuno dei sei antigeni. Se sono presenti bassi livelli di autoanticorpi multipli il test di screening con provetta singola ENA RELISA[®] può mostrare un risultato positivo, ma le singole specificità possono essere al di sotto del valore di cut-off per ciascuno.

RIPORTO DEI RISULTATI

I risultati devono essere riportati come positivi o negativi per anticorpi contro gli antigeni nucleari estraibili. I valori degli anticorpi non hanno alcun significato clinico noto.

LIMITI DEL TEST

1. La diagnosi non può essere fatta solo sulla base di anticorpi diretti contro gli antigeni nucleari estraibili. Il medico deve interpretare questi risultati confrontandoli con l'anamnesi e i sintomi del paziente, i dati fisici e altre procedure diagnostiche.
2. La cura non va iniziata sulla sola base di un test positivo per gli anticorpi anti-ENA. Prima di iniziare qualunque trattamento devono essere considerate indicazioni cliniche, altri risultati di laboratorio e l'impressione clinica del medico.
3. Alcuni pazienti con immunopatie hanno livelli di anticorpi contro gli antigeni nucleari estraibili non rilevabili o insignificanti e alcuni soggetti possono avere livelli alti di anticorpi diretti contro gli antigeni nucleari estraibili ma poca o nessuna evidenza di patologia clinica. Il medico deve interpretare i risultati delle analisi degli anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili confrontandoli con l'anamnesi e i sintomi del paziente, i dati fisici e altre procedure diagnostiche.
4. I livelli di anticorpi rilevati con questo sistema di analisi non indicano necessariamente la gravità o la durata della patologia.

VALORI ATTESI

L'incidenza degli autoanticorpi contro diversi antigeni nucleari varia a seconda del gruppo di pazienti e dell'incidenza clinica delle patologie reumatiche cliniche in quel gruppo. L'associazione degli anticorpi a specifiche patologie reumatiche è riassunta in Tabella 1.

Tabella 1

Anticorpi diretti contro:	Associazione con patologie:
Sm	Anticorpo marcatore altamente specifico visto nel 25-30% di pazienti con SLE
U1-RNP	Patologia mista del tessuto connettivo >95%; SLE 35%; minore frequenza nel lupus discoide o nella sclerosi progressiva sistemica (PSS)
SSA/Ro	Sindrome di Sjögren 60-70%; SLE 50%
SSB/La	Sindrome di Sjögren 40-50%; SLE 15%
ScI-70	Anticorpo marcatore altamente specifico visto nel 15-20% di pazienti con PSS
Jo-1	Anticorpo marcatore altamente specifico visto nel 25-30% di pazienti con polimiosite o dermatomiosite

RANGE DI RIFERIMENTO

Il range di riferimento fu fissato analizzando i sieri di 403 donatori di sangue sani, 205 femmine e 198 maschi, nessuno dei quali aveva alcuna storia nota di patologie reumatiche. Sulla base di questi dati, i normali valori di cut-off furono fissati a meno di 20 unità ENA. La buona pratica di laboratorio vuole che ciascuno fissi i range normali sulla base dei propri gruppi di pazienti e di altri fattori locali.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il test di screening con provetta singola ENA RELISA® della Immuno Concepts fu confrontato col test di screening ENA multiparametro RELISA® della Immuno Concepts. Il gruppo di pazienti studiato consisteva di 50 pazienti che soddisfacevano i criteri per la diagnosi di lupus eritematoso sistemico, 25 pazienti con miosite autoimmune o sindrome di miosite coincidente, 23 pazienti con una diagnosi di sclerodermia o sclerosi progressiva sistemica, 21 pazienti con sindrome di Sjögren, 3 pazienti con una diagnosi di artrite reumatoide, 18 pazienti con malattia del tessuto connettivo indifferenziata e 403 soggetti con immunopatia sconosciuta. Sulla base di questo confronto, furono ottenuti i dati che seguono. Tabella 2.

		RELISA® Immuno Concepts		
		Tabella 2 Test di Screening degli ENA Multiparametro		
Immuno Concepts Pozzetto Singolo RELISA® Test di Screening degli ENA		Positivo	Borderline	Negativo
	Positivo	126	9	5
	Borderline	0	2	4
	Negativo	1	2	394

I risultati borderline vennero considerati positivi. Questi dati danno origine alla seguente statistica: sensibilità relativa, 97,9%; specificità relativa, 97,8%; e accordo complessivo 97,8%.

RIPRODUCIBILITÀ

Vennero elaborati, in tre diverse occasioni, sei campioni positivi e cinque negativi su tre diversi numeri di lotto di strisce di antigene. In nessun caso un campione negativo mostrò risultati positivi e campioni positivi dettero coerentemente risultati chiaramente positivi.

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 (Kinetochore) 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). 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.
- 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., 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.
- 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.
- 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.
- Wasicek, 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.
- Conrad, K., ed., *Autoantibodies in Systemic Autoimmune Disease – A Diagnostic Reference*, 2nd edition, Dresden, Pabst, 2007: 167-172.
- Guldner, H.H., Szosteki, C., Vosberg, H.P., et al. Sci 70 Autoantibodies from Scleroderma Patients Recognize a 95 kDa Protein Identified as DNA Topoisomerase I. *Chromosoma* 94:132-138, 1986.
- Jarzabek-Chorzelska, M., Blaszczyk, M., Jablonska, S., et al. Sci 70 Antibody-A Specific Marker of Systemic Sclerosis. *Brit. J. Dermatol.* 115:393-401, 1986.
- Bernstein, R.M., Morgan, S.H., Chapman, J., et al. Anti-Jo-1 Antibody: A marker for Myositis with Interstitial Lung Disease. *Brit. Med. J.* 289:151-152, 1984.

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

PROCEDURA DI ANALISI SCREENING DEGLI ENA CON POZZETTO SINGOLO RELISA®

Prima dell'uso tutti i campioni, i reagenti (compresa la soluzione tampone di lavaggio) e i micropozzetti devono essere a temperatura ambiente.

- 1. PREPARAZIONE DEL MODULO DI PROTOCOLLO**
Indicare nel modulo di protocollo accluso nel kit la posizione dei campioni nei micropozzetti. Analizzare il calibratore in duplicato. Un pozzetto viene usato per il bianco del reagente. Raccomandiamo di analizzare in duplicato ciascun controllo e campione del paziente, fino a che non si sia stabilita una precisione accettabile per l'analisi nel proprio laboratorio.
 - 2. PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVAGGIO TAMPONE (PBS-Tween)**
Sciogliere il contenuto di una busta di tampone PBS in un litro di acqua deionizzata o distillata. Aggiungere l'intero contenuto di un flacone di concentrato di tampone di lavaggio al contenitore di PBS sciolto. Mescolare bene. La soluzione tampone di lavaggio può essere coperta e conservata a 2-25°C fino a quattro settimane.
 - 3. DILUIZIONE DEI CAMPIONI DEI PAZIENTI**
Diluire i campioni del paziente a 1:40 aggiungendo 25 µl di siero a 975 µl di diluente per campioni. Se si usa il controllo positivo ENA non diluito opzionale, diluirlo allo stesso modo dei campioni dei pazienti. Mescolare bene. Il calibratore, il controllo positivo e il controllo negativo sono forniti alla diluizione di lavoro e non ne richiedono una ulteriore.
 - 4. PREPARAZIONE DEI MICROPOZZETTI**
Rimuovere i micropozzetti necessari dalle rispettive buste e metterli nel supporto. I micropozzetti devono essere saldamente sistemati nel supporto. Premere con forza su entrambe le estremità delle strisce in modo che stiano ben ferme nel supporto. Se si usano pozzetti singoli o meno di una striscia completa di pozzetti, assicurarsi che ogni pozzetto sia ben fermo. I pozzetti ben sistemati nel supporto non cadono quando il supporto viene capovolto. Se per l'analisi sono necessari meno di otto pozzetti, questi possono essere separati staccandoli. Le strisce non utilizzate possono essere rimesse nel sacchetto con essiccante provvisto di un'apposita chiusura a zip per sigillarlo e refrigerate fino a 45 giorni.
 - 5. EROGAZIONE DELLE DILUIZIONI DEL SIERO**
Erogare 100 µl dei calibratori, dei controlli e dei campioni diluiti dei pazienti nei pozzetti appropriati come descritto nel modulo di protocollo. Erogare 100 µl di diluente per campioni nel pozzetto bianco del reagente.
 - 6. INCUBAZIONE DELLE STRISCE (30 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**
Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Durante l'incubazione, le strisce devono essere protette da correnti d'aria o variazioni di temperatura. Le strisce possono essere eventualmente coperte con nastro trasparente o con carta assorbente per proteggerle dalla polvere o da altri corpi estranei.
 - 7. LAVAGGIO DELLE STRISCE (consultare le note procedurali generali 5 e 6)**
Lavare i pozzetti da 3 a 5 volte con soluzione di lavaggio tampone PBS-Tween. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, poi riempirne ciascuno con soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti, particolarmente nel primo lavaggio dopo l'aspirazione. Far scorrere tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e di drenaggio per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere passati con forza su carta assorbente o altro materiale assorbente in modo da eliminare ogni traccia di residuo di tampone di lavaggio.
 - 8. EROGAZIONE DEL REAGENTE ANTICORPO ENZIMATICO**
Erogare 100 µl di reagente anticorpo enzimatico in ciascun pozzetto.
 - 9. INCUBAZIONE DELLE STRISCE (30 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**
Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Durante l'incubazione, le strisce devono essere protette da correnti d'aria o variazioni di temperatura. Le strisce possono essere eventualmente coperte con nastro trasparente o con carta assorbente per proteggerle dalla polvere o da altri corpi estranei.
 - 10. LAVAGGIO DELLE STRISCE**
Lavare i pozzetti da 3 a 5 volte con soluzione di lavaggio tampone PBS-Tween. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, poi riempirne ciascuno con soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti, particolarmente nel primo lavaggio dopo l'aspirazione. Drenare tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e di drenaggio per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere passati con forza su carta assorbente o altro materiale assorbente in modo da eliminare ogni traccia di residuo di tampone di lavaggio.
 - 11. EROGAZIONE DELLA SOLUZIONE SUBSTRATO**
Usando un timer per assicurare intervalli coerenti, erogare 100 µl di soluzione substrato in ciascun pozzetto. La soluzione substrato deve essere aggiunta a tasso regolare in modo che ciascun pozzetto sia incubato esattamente per lo stesso tempo (30 minuti). La soluzione substrato nei pozzetti incubati con campioni positivi virerà al blu e la soluzione nei pozzetti incubati con campioni negativi sarà da incolore a blu molto chiaro.
 - 12. INCUBAZIONE DELLE STRISCE (30 minuti esatti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**
Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Durante l'incubazione, le strisce devono essere protette da correnti d'aria o variazioni di temperatura.
 - 13. EROGAZIONE DEL REAGENTE BLOCCANTE**
Dopo che il primo pozzetto è stato incubato per 30 minuti esatti, aggiungere 100 µl di reagente bloccante nello stesso ordine e allo stesso tasso con cui era stato aggiunto ai pozzetti la soluzione substrato. Al momento dell'aggiunta del reagente bloccante, la soluzione di substrato blu vira al giallo e quella incolore resta incolore.
 - 14. LETTURA DELL'ASSORBANZA DEI POZZETTI**
Entro 30 minuti dall'aggiunta del reagente bloccante, i pozzetti devono essere letti in uno spettrofotometro per la lettura della piastra. I pozzetti vengono letti a 450 nm rispetto al pozzetto di controllo del bianco. Se è disponibile uno spettrofotometro a lunghezza d'onda doppia, la lunghezza d'onda per il filtro di riferimento deve essere 600-650 nm. La lettura dei micropozzetti a 450 nm senza filtro di riferimento avrà come risultato valori di assorbanza più alti.
- PER ASSISTENZA TECNICA:** +1-916-363-2649
oppure a mezzo e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com