



SISTEMA DE TESTE AUTO I.D.[®] DE AUTOANTICORPOS PARA SSA/Ro e SSB/La

**Para uso em diagnóstico in vitro
Para uso profissional**

USO PRETENDIDO: Este é um sistema de teste de imunodifusão de Ouchterlony para detecção de autoanticorpos para SSA/Ro, SSB/La outros autoantígenos em soro humano. Os resultados deste sistema de teste podem ser usados para ajudar a diagnosticar lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren 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).

SSA e SSB foram descritos originalmente como antígenos nucleares da proteína-RNA em pacientes com síndrome de Sjögren (6, 7). Ro e La foram descritos como antígenos citoplasmáticos da proteína-RNA em pacientes com LES (15, 16). Agora, é amplamente aceito que SSA e Ro são análogos, SSB e La são análogos, e esses antígenos são encontrados no núcleo e no citoplasma. Os autoanticorpos para SSA/Ro sozinhos ou SSA/Ro e SSB/La são encontrados em até 70% a 90% de pacientes com lúpus cutâneo subagudo (11, 17) e em 85% dos pacientes com síndrome de Sjögren que desenvolvem vasculite (18). Os anticorpos para SSA/Ro sozinho ocorrem em pacientes que têm deficiência homozigótica da fração C2 do complemento (11, 19), em pacientes com cirrose biliar primária que desenvolvem síndrome de Sjögren (20), e em até dois terços de pacientes com "LES negativo para ANA" (21).

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-imunoelektroforese 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.[®] de autoanticorpo para SSA/Ro e SSB/La da Immuno Concepts para detecção de anticorpos para antígenos nucleares SSA/Ro e SSB/La usa 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 colocadas 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 ter melhores resultados, armazenar o antígeno reconstituído em alíquotas de 30 µl a -20 °C ou menos.

REAGENTES REATIVOS

Antígeno nuclear AUTO I.D.®: N° de 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.

Controle positivo para SSA/Ro/SSB/La: N° de Cat. 7002 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígenos nucleares SSA/Ro e SSB/La. Este soro apresenta fortes linhas de precipitação de identidade para os soros de referência dos CDC para esses antígenos.

Controle positivo para SSA/Ro: N° de Cat. 7001 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígeno nuclear SSA/Ro. 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.®: N° de 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 24 °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 SSB/La: N° de Cat. 7003 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígeno nuclear SSB/La.

Soro de controle positivo para RNP: N° de Cat. 6001 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígeno nuclear Ribonucleoproteína U1 (RNP).

Soro de controle positivo para Sm/RNP: N° de Cat. 6002 (0,5 ml). Frasco pronto para usar que contém anticorpos humanos reativos com antígenos nucleares Smith (Sm) e Ribonucleoproteína U1 (RNP).

Soro de controle positivo para Jo-1: N° de 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: N° de 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: N° de 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.
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 repouse por pelo menos 30 minutos em temperatura ambiente antes de usar para ter certeza que antígeno está completamente dissolvido.
6. A substituição de componentes de outros Sistemas de teste de autoanticorpos 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 fosfolípidos, 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 (SSA/Ro)
- Poço 3 - Paciente 2
- Poço 4 - Controle de anticorpo misto (SSA/Ro/SSB/La)
- Poço 5 - Paciente 3
- Poço 6 - Controle de anticorpo misto (SSA/Ro/SSB/La)
- Poço do centro - Antígeno nuclear

Seleção de alto volume e/ou titulação (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 (SSA/Ro/SSB/La)
- Poço do centro - Antígeno nuclear

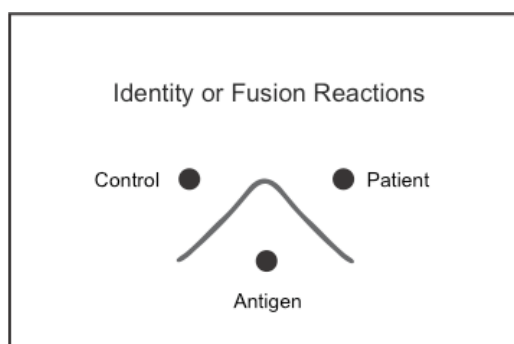
As amostras de soro dos pacientes que apresentam linhas de precipitina pelo Método 2 depois de 18 a 24 horas, devem ser testadas novamente quanto à especificidade, segundo o Método 1.

COLETA DE AMOSTRA

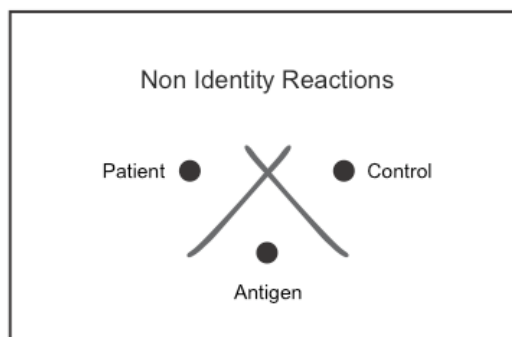
O soro deve ser coletado por técnica asséptica. O soro deve ser separado do coágulo por centrifugação, assim que possível para evitar a hemólise. As amostras de soro que apresentarem alto grau de hemólise, lipemia ou crescimento microbiano não devem ser usadas. O soro pode ser armazenado de 2 °C a 10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

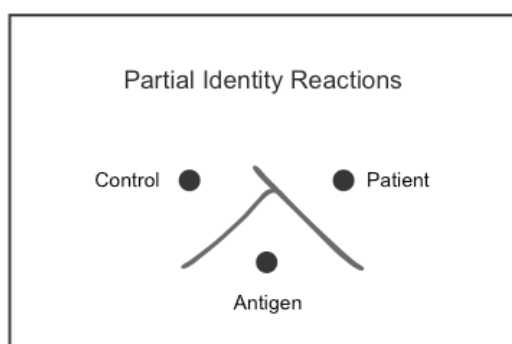


As linhas de precipitina que formam uma linha contínua entre o soro do paciente e o de controle indicam que os anticorpos em cada soro estão reagindo com antígenos nucleares idênticos. As amostras de pacientes que apresentam linhas de precipitina de identidade são relatadas como positivas com especificidade 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.

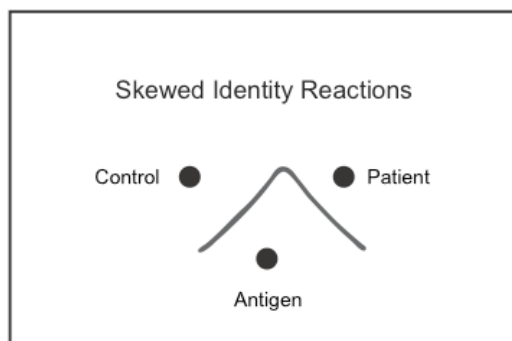
As amostras que apresentem linhas de precipitina são relatadas como positivas com reatividade de “linha de precipitina indefinida” (UPL). Recomenda-se realizar mais testes com outros controles para determinar a especificidade do anticorpo (Ver “Componentes ideais disponíveis”).



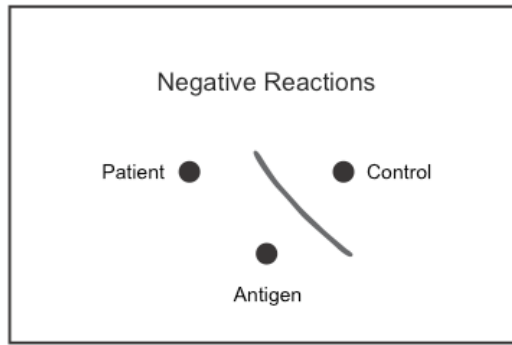
As linhas de precipitina que formam uma “projeção” entre o poço de soro do paciente e o de soro de controle indicam que os anticorpos do paciente e do controle estão reagindo com antígeno idêntico, mas que o soro do paciente também contém um anticorpo que reage com um antígeno diferente que não reage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

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.

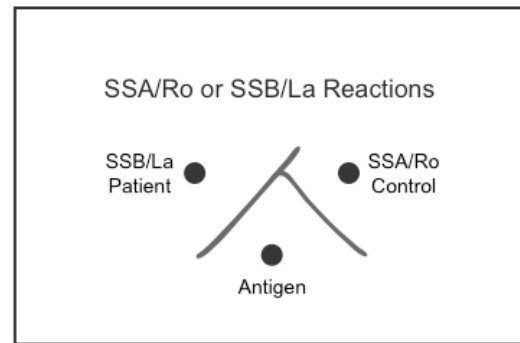
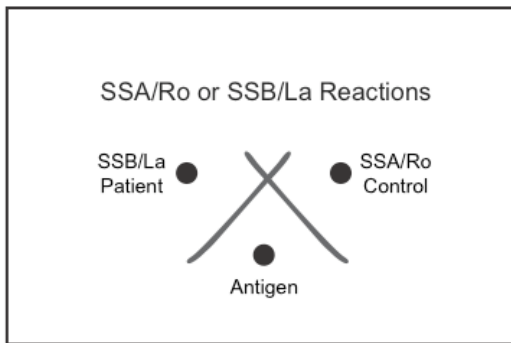


A linha de precipitina forma-se apenas com o soro de controle. As amostras do paciente que não formam linhas de precipitina são relatadas como negativas.

INTERPRETAÇÃO TÉCNICA

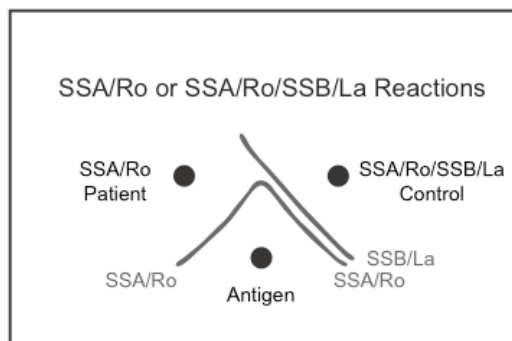
SSA/Ro ou SSB/La

Os anticorpos para SSA/Ro e SSB/La em geral demonstram linhas de precipitina que cruzam, indicando não-identidade. As linhas de precipitina do SSA/Ro comumente são estreitas e nítidas, ao passo que as de SSB/La podem aparecer mais largas e menos definidas.



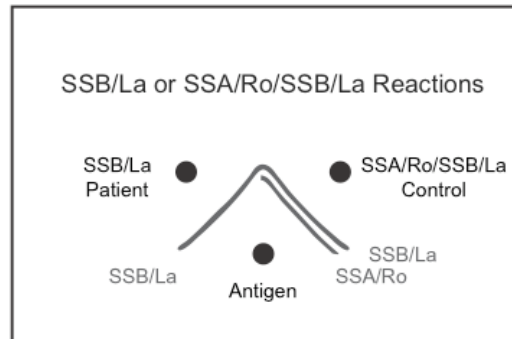
SSA/Ro ou SSA/Ro/SSB/La

Os soros monoespecíficos para anticorpos SSA/Ro são, em geral, diferenciados dos soros que contêm anticorpos para SSA/Ro e para SSB/La, por meio de avaliação das características da precipitina e da reatividade com os soros de controle. Os soros com anticorpos para SSA/Ro sozinho em geral formam um linha de precipitina estreita e nítida, com identidade para o controle de SSA/Ro. Os soros com anticorpos para SSA/Ro e para SSB/La demonstram linha de precipitina estreita com identidade para o controle de SSA/Ro e uma linha de precipitina larga, que mostra identidade com o controle de SSB/La. Em certos soros positivos para anticorpos para SSA/Ro e SSB/La, as duas linhas de precipitina podem demonstrar fusão parcial.



SSB/La ou SSA/Ro/SSB/La

A diferenciação dos soros monoespecíficos para anticorpos para SSB/La dos soros que contêm anticorpos para SSA/Ro/SSB/La pode ser difícil, porque, normalmente, a linha de precipitina de SSB/La é mais larga e menos definida que a linha de precipitina de SSA/Ro. Para confirmar que o soro contém anticorpos tanto para SSA/Ro quanto para SSB/La, ambas as linhas de precipitina precisam ser claramente visíveis. Em geral, observam-se uma linha de precipitina larga que demonstra identidade para o controle de SSB/La e uma linha de precipitina estreita que demonstra identidade para o controle de SSA/Ro. A linha de precipitina de SSA/Ro pode parecer parcialmente fundida com a linha de precipitina de SSB/La. A diluição em série dos soros pode melhorar a diferenciação das duas linhas de precipitina.



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 autoanticorpos 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 precipitina 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

Deteção: O Sistema de teste AUTO I.D.[®] para autoanticorpo para SSA/Ro/SSB/La da Immuno Concepts foi testado com um total de 61 amostras positivas e negativas de soro de paciente, obtidas de laboratórios de referência qualificados (22). Houve 96,7% de concordância em todos os soros testados. Oito soros foram positivos para anticorpos para SSB/La, um soro foi positivo para anticorpos para SSA/Ro e SSB/La e três foram positivos para anticorpos para SSA/Ro. Quinze soros apresentaram “linhas de precipitina indefinidas” (UPLs). Em outros testes com o Sistema de teste AUTO I.D.[®] de autoanticorpo para Sm/RNP da Immuno Concepts, 12 dos soros foram positivos para anticorpos para RNP, dois foram positivos para anticorpos para Sm/RNP e um soro foi positivo para anticorpos para Sm. Trinta e dois soros foram negativos para qualquer anticorpo detectável para antígenos nucleares. Os dois soros discrepantes foram originalmente relatados como positivos para anticorpos para SSA/Ro e SSA/Ro/SSB/La, respectivamente. Esses soros foram mais testados com outros testes encontrados no comércio e apresentaram linhas de precipitina indistintas em comparação com os controles prototípicos de SSA/Ro, SSB/La, Sm e U1-RNP (não foi possível detectar linhas nítidas de identidade ou não-identidade).

Precisão: Seis soros positivos para anticorpos para SSA/Ro/SSB/La foram testados em duplicata em três ocasiões. Em todos os casos, todos os resultados de teste apresentaram especificidades idênticas para anticorpo: cinco soros foram uniformemente positivos para anticorpos para SSA/Ro e SSB/La e um foi uniformemente positivo para anticorpos para SSB/La.

BIBLIOGRAFIA

- Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *Biol. Chem.* 245:10514 - 10522, 1979.
- Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M.J., et al. Autoantibody to Centromere (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). *Am. J. Med.* 52:148-159, 1972.
- Sharp, G.C., Irwin, W.S., May, L.M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
- Alspaugh, M.A., Tan, E.M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073, 1975.
- Alspaugh, M.A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
- Wolfe, J.F., Adelstein, E., Sharp, G.C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
- Nishikai, M., Reichlin, M. Purification and Characterization of a Nuclear, Nonhistone Basic Protein (Mi-1) Which Reacts with Antiimmunoglobulin Sera and the Sera of Patients with Dermatomyositis. *Mol. Immunol.* 17:1129-1131, 1980.
- Alspaugh, M. A., Tan, E.M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 29:711-719, 1976.
- von Mühlen, C.A. and Tan, E.M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. *Sem. Arthritis Rheum.* 24:323-358, 1995.
- Holden, D.J., Brownell, A.K.W., and Fritzler, M.J. Clinical and Serologic Features of Patients with Polymyositis or Dermatomyositis. *Can. Med. Assoc. J.* 132:649-653, 1985.
- Hoy, E.S. Detection of Autoantibodies to the SSA/Ro Antigen: Comment on the Article by Boire et al (letter). *Arthritis Rheum.* 35:1109-1112, 1992.
- Fritzler, M.J., Tan, E.M. Antinuclear Antibodies and the Connective Tissue Diseases. In: *Laboratory Diagnostic Procedures in the Rheumatic Diseases (Third Edition)*, Chapter 8, Grune and Stratton, 1985.
- Clark, G., Reichlin, M., and Tomasi, T.B. Characterization of a Soluble Cytoplasmic Antigen Reactive with Sera from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 102:117-122, 1969.
- Mattioli, M. and Reichlin, M. Heterogeneity of RNA Protein Antigens Reactive with Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 17:421-429, 1974.
- Sontheimer, R.D., Maddison, P.J., Reichlin, M., et al. Serologic and HLA Associations in Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus, a Clinical Subset of Lupus Erythematosus. *Ann. Intern. Med.* 97:664-671, 1982.
- Alexander, E.L., Arnett, F.C., Provost, T.T., et al. Sjögren's Syndrome: Association of Anti-Ro (SSA) Antibodies with Vasculitis, Hematologic Abnormalities, and Serologic Hyperreactivity. *Ann. Intern. Med.* 98:155-159, 1983.
- Provost, T.T., Arnett, F.C., and Reichlin, M. Homozygous C2 Deficiency, Lupus Erythematosus, and Anti-Ro (SSA) Antibodies. *Arthritis Rheum.* 26:1279-1282, 1983.
- 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.
- Dados arquivados por 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. 9779 Business Park Drive Sacramento, CA. 95827
Assistência Técnica EUA: 1.800.251.5115 Fora dos EUA: 1.916.363.2649
Email: techservice@immunoconcepts.com

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 24 °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 24 °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 dos 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 24 °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 artefato 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: techservice@immunoconcepts.com

