



## **TEST RELISA® PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-Sm/RNP**

*Per uso diagnostico in vitro*

*Per uso professionale*

**Numeri di catalogo: 7096-09.Sm/RNP (96 pozzetti) e 7696-09.Sm/RNP (576 pozzetti)**

*USO PREVISTO Il test in oggetto è un sistema di analisi a dosaggio immunoenzimatico (EIA – Enzyme Immuno Assay) per la determinazione degli anticorpi all'antigene nucleare estraibile Sm (Smith) e RNP (U1-RNP o ribonucleoproteina) nel siero umano. I risultati di questo saggio possono essere utilizzati a supporto della diagnosi di lupus eritematoso sistemico, connettivite mista o altre malattie reumatiche.*

### **RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE SUL TEST**

Gli anticorpi diretti contro gli antigeni nucleari estraibili (ENA, Extractable Nuclear Antigen) sono stati associati con numerose sindromi autoimmuni e sembrano assumere un valore diagnostico e/o prognostico nella sclerosi sistemica (1,2) nella connettivite mista (3-5), nella sindrome di Sjögren (6,7), nella polimiosite (8), nella dermatomiosite (9), nel lupus eritematoso sistemico (5) e nell'artrite reumatoide (10). L'analisi degli anticorpi antinucleari (ANA, Antinuclear Antibodies) è stata invece utilizzata come metodologia di screening di questi anticorpi, anche se gli ANA non sono indicativi della specificità dell'anticorpo e gli anticorpi ad alcuni ENA non si associano con un test ANA positivo (11,12). Pertanto si raccomanda vivamente l'esecuzione di un secondo test a conferma della presenza di anticorpi anti-ENA (13).

L'antigene Sm (Smith) è stato identificato nel 1966 da Tan e Kunkel come una glicoproteina non istonica, solubile in soluzione fisiologica, la cui antigenicità non è dipendente dal DNA o dall'RNA (14). Gli anticorpi all'antigene Sm sono considerati un marcatore sierologico specifico a causa della loro alta specificità per il lupus eritematoso sistemico. Questi anticorpi sono osservati finanche nel 30% dei pazienti con LES e sono stati associati con la patologia renale attiva e con la cerebrita (15-18).

Gli anticorpi all'antigene Sm si evidenziano con frequenza insieme agli anticorpi anti-U1-RNP nel siero dei pazienti con LES (19,20). A differenza degli anticorpi anti-Sm, gli anticorpi anti-RNP non sono considerati un marcatore sierologico specifico in quanto si ritrovano in un'ampia gamma di patologie reumatiche tra cui LES, sclerodermia, sindrome di Sjögren e artrite reumatoide. Nonostante ciò, livelli elevati di anticorpi anti-RNP mostrano una forte correlazione con la sindrome da sovrapposizione (overlap) denominata connettivite mista (MCTD, Mixed Connective Tissue Disease) la quale è caratterizzata da una combinazione di caratteristiche cliniche osservate nel LES, nella sclerodermia e nella polimiosite. I pazienti affetti da questa patologia evidenziano frequentemente una buona risposta al trattamento con corticosteroidi e una minore incidenza di malattie renali rispetto ai pazienti con LES (21, 22).

### **PRINCIPIO DEL TEST**

Il test in oggetto è un saggio immunoenzimatico (EIA - Enzyme Immunoassay) indiretto. In questo sistema di analisi, la superficie dei micropozzetti è rivestita con preparazioni stabilizzate dell'antigene Sm (Smith) e Sm/RNP purificato per



affinità, che è utilizzato come antigene di substrato. Il test RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-Sm/RNP rileva la presenza di anticorpi anti-Sm/RNP, anti-Sm o anti-RNP. Per poter ottenere un risultato positivo o negativo per gli anti-RNP nel campione del paziente, il test RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-Sm/RNP deve eseguito in parallelo con il test RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-Sm nelle stesse condizioni d'esame e alla stessa diluizione del siero del paziente, effettuando i calcoli con i metodi descritti nel paragrafo su l'Interpretazione dei risultati. I campioni diluiti prelevati dal paziente sono dispensati nei micropozzetti e incubati lasciando reagire gli anticorpi del campione con l'antigene della fase solida. Dopo il lavaggio per la rimozione dell'anticorpo non legato e delle altre proteine del siero, i pozzetti sono incubati con anticorpi anti-umani coniugati con perossidasi di rafano. Il preparato di anticorpo coniugato alla perossidasi di rafano incluso nel sistema di analisi è specifico per le catene leggere e pesanti della IgG umana.

Dopo l'incubazione con l'anticorpo coniugato con la perossidasi di rafano, in presenza di risultati positivi si forma un complesso stabile in tre parti. Questo complesso è composto dall'anticorpo anti-umano coniugato con la perossidasi di rafano legante l'anticorpo anti-ENA umano che è legato all'antigene stabilizzato sulla superficie di plastica.

Dopo un'ulteriore fase di lavaggio, il complesso viene rilevato aggiungendo una soluzione di tetrametilbenzidina (TMB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> come substrato cromogenico. Il grado di sviluppo del colore in ciascun pozzetto è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi anti-ENA in ciascun campione di siero. Ciascun micropozzetto è letto in uno spettrofotometro a 450 nm.

## COMPONENTI DEL SISTEMA – MATERIALI FORNITI

**Conservazione:** tutti i componenti devono essere conservati in frigo ad una temperatura compresa tra 2 e 10 °C. Non congelare.

**Stabilità:** tutti i componenti rimangono stabili per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Non usare nessuno dei componenti dopo la data di scadenza.

### REAGENTI REATTIVI

**Strisce di micropozzetti rivestiti con l'antigene Sm/RNP (complesso Smith/Ribonucleoproteina):** n. di catalogo 7008-09.Sm/RNP. Piastra con dodici strisce, ciascuna contenente otto pozzetti rivestiti con una soluzione stabilizzata di antigene nucleare Sm e RNP purificato per affinità. Le strisce non utilizzate possono essere reintrodotte nel sacchetto con l'essiccante dotato di una chiusura sigillante a zip e conservate in frigo fino ad un massimo di 45 giorni.

**Diluente per campioni:** n. di catalogo 7100 (100 ml). Diluente per campioni tamponato proprietario, utilizzato per la diluizione dei campioni prelevati dal paziente.

**Reagente anticorpo enzimatico specifico per IgG umana (catena leggera e pesante):** n. di catalogo 7009-09 (14 ml). IgG anti-umana di capra (H&L) coniugata con perossidasi di rafano (HRP). Reagente pronto per l'uso.

**Soluzione di substrato:** n. di catalogo 7035 (14 ml). Soluzione di substrato enzimatica HRP-specifica, contenente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e perossido d'idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Reagente pronto per l'uso.

**Reagente bloccante:** n. di catalogo 7033 (14 ml). Reagente bloccante proprietario per i test EIA della Immuno Concepts. Reagente pronto per l'uso. **ATTENZIONE:** agente corrosivo. Questo reagente contiene acido solforico e acido cloridrico (meno del 3% ciascuno in volume) e deve essere maneggiato con cautela. Tenere fuori della portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico. Non aggiungere mai acqua a questo reagente.

**Siero di calibrazione con anticorpi anti-Sm/RNP:** n. di catalogo 7026-09.Sm/RNP (3 ml). Siero umano contenente anticorpi contro l'antigene RNP. Il valore del calibratore per questo siero è riportato sull'etichetta della provetta. Questo siero è fornito alla diluizione di lavoro ed è pronto per l'uso.

**Controllo positivo con anticorpi anti-Sm/RNP:** n. di catalogo 7021-09.Sm/RNP (3 ml). Siero umano di controllo positivo contenente anticorpo specifico per antigeni nucleari Sm e/o RNP. Questo siero è fornito alla diluizione di lavoro ed è pronto per l'uso.

**Controllo negativo:** n. di catalogo 7031 (2 ml). Siero umano di controllo negativo che non contiene anticorpi contro l'antigene Sm o RNP. Questo siero è fornito alla diluizione di lavoro ed è pronto per l'uso.

## COMPONENTI NON REATTIVI

### Supporto per micropozzetti

#### Soluzione tampone di lavaggio

**Tampone PBS:** n. di catalogo 1011. Polvere salina tamponata al fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Ogni busta contiene una quantità di polvere tamponata sufficiente ad ottenere 1 litro di soluzione tampone di lavaggio (nei kit completi per l'analisi, per ciascuna piastra da 96 micropozzetti sono fornite due buste di polvere tamponata).

**Concentrato per tampone di lavaggio:** n. di catalogo 1031 (10 ml). Soluzione Tween 20 al 5% da utilizzare nel tampone di lavaggio (nei kit completi per l'analisi, per ciascuna piastra da 96 micropozzetti sono fornite due fiale di concentrato per tampone).

**Preparazione:** sciogliere il contenuto di una busta della polvere per tampone in un litro di acqua deionizzata o distillata. Aggiungere l'intero contenuto di un flacone di concentrato per tampone di lavaggio al PBS sciolto. Miscelare bene e conservare in frigorifero ad una temperatura di 2-10° C per un massimo di quattro settimane o fino alla comparsa di segni di contaminazione o di altri cambiamenti visibili. Prima dell'uso la soluzione del tampone di lavaggio deve essere a temperatura ambiente (18-24 °C).

## ALTRO MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO

Pipette volumetriche di precisione per la dispensazione di volumi compresi tra 25 e 1000 µl.  
Spruzzetta per l'erogazione della soluzione tamponata di lavaggio nei micropozzetti oppure sistema di lavaggio automatico o semi-automatico dei micropozzetti.  
Contenitore da un litro per soluzione tampone di lavaggio PBS.  
Acqua distillata o deionizzata.  
Spettrofotometro per la lettura della piastra con capacità di lettura dell'assorbanza a 450 nm.  
Provette per la diluizione del siero.  
Carta bibula o salviette assorbenti.  
Pipetta multicanale con capacità di dispensazione a 8 pozzetti.  
Guanti monouso.  
Timer da laboratorio.

## PRECAUZIONI

1. Tutti i materiali di origine umana utilizzati per questo prodotto sono stati analizzati e sono stati trovati negativi (non ripetutamente reattivi) per gli anticorpi al virus dell'immunodeficienza umana-1 (HIV-1), al virus dell'immunodeficienza umana-2 (HIV-2), al virus dell'epatite C (HCV) e all'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) con metodologie approvate dalla FDA. Tuttavia, poiché nessun metodo d'analisi può offrire la completa garanzia dell'assenza dei virus HIV-1, HIV-2, dell'epatite C, dell'epatite B o di altri agenti infettivi, tutti i materiali devono essere manipolati nella stessa maniera come materiali potenzialmente infetti.
2. Tutti i sieri di controllo, i sieri di calibrazione e i campioni prelevati dai pazienti devono essere manipolati ad un livello di biosicurezza 2 come raccomandato per qualunque siero umano o campione ematico potenzialmente infetto nel Manuale elaborato dai *Centres for Disease Control/National Institutes of Health, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Ed. 1999*.
3. La diluizione dei componenti o la sostituzione degli stessi con altri diversi da quelli forniti con questo sistema d'analisi, può produrre risultati non coerenti.
4. La sodio azide (0,09 %) viene utilizzata come conservante dei sieri di controllo. Essa può reagire con il piombo o il rame di cui sono composte le condutture idrauliche e formare azoturi metallici altamente esplosivi. Quando si eliminano i reagenti, pertanto, far scorrere grandi quantità di acqua corrente per impedire il deposito di potenziali residui nelle tubature. La sodio azide è un veleno e se ingerita può essere tossica.
5. Questo kit è per uso diagnostico *in vitro*.
6. Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la pelle e con le mucose. In caso di contatto, lavare con un sapone germicida e abbondante acqua.
7. Non fumare, mangiare o bere nelle aree destinate alla manipolazione dei campioni o dei reagenti del kit.
8. Evitare sempre spruzzi o la formazione di aerosol.
9. Temperature e tempi d'incubazione diversi da quelli specificati possono produrre risultati errati.
10. La contaminazione crociata dei reagenti o dei campioni può produrre risultati falsi. Durante l'analisi, i campioni devono rimanere all'interno dei micropozzetti.
11. Prima dell'uso la vetreria di laboratorio riutilizzabile deve essere lavata e accuratamente risciacquata per essere liberata da eventuali tracce di detergente. Prima dell'uso tutta la vetreria deve essere pulita e asciutta.

12. Prima dell'uso portare tutti i reagenti, i micropozzetti e i campioni a temperatura ambiente (18-24° C).
13. Durante la manipolazione dei reagenti e dei campioni indossare guanti monouso e dopo lavare accuratamente le mani.
14. La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può produrre risultati falsi.
15. Il reagente bloccante è corrosivo e può causare ustioni. Questo reagente contiene acido solforico e acido cloridrico (meno del 3% ciascuno in volume) e deve essere maneggiato con cautela. Tenere fuori della portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico. Non aggiungere mai acqua a questo reagente.

## RACCOLTA DEI CAMPIONI

**Raccolta:** il siero è il campione di preferenza. Prelevare circa 5 ml di sangue intero con tecnica aseptica tramite venipuntura utilizzando una provetta di raccolta a vuoto sterile o un altro sistema di raccolta adatto. Lasciar coagulare il sangue a temperatura ambiente (18-24° C). Appena possibile il siero deve essere separato dal coagulo tramite centrifugazione per ridurre al minimo l'emolisi.

**Sostanze interferenti:** i sieri che mostrano un grado elevato di emolisi, ittero, lipemia o proliferazione microbica non devono essere utilizzati in quanto queste condizioni possono produrre risultati aberranti. I campioni che contengono particolato visibile devono essere ripuliti tramite centrifugazione prima dell'analisi.

**Conservazione:** i sieri possono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2 e 10 °C fin ad un massimo di una settimana. Se l'analisi è ulteriormente rimandata, i sieri devono essere conservati congelati ad una temperatura di -20° C o inferiore. Non conservare il siero in un congelatore o in un frigorifero con sistema autosbrinante.

**ATTENZIONE:** il ripetuto congelamento/scongelamento dei campioni può produrre risultati falsi negativi o falsi positivi.

## NOTE PROCEDURALI GENERALI

1. Prima dell'uso è estremamente importante che tutti i componenti del kit e i campioni di siero siano a temperatura ambiente (18-24 °C). Per portare alla temperatura di 20 °C un intero litro di tampone di lavaggio dopo averlo tolto dal frigorifero, possono essere necessarie molte ore. Temperature d'incubazione superiori o inferiori all'intervallo prestabilito possono produrre risultati inaccurati. Dopo l'uso riporre i campioni e i reagenti non utilizzati in frigo.
2. Mescolare bene i reagenti prima dell'uso, capovolgendo i contenitori con delicatezza. Non far vorticare o scuotere i reagenti. Evitare la formazione di schiuma.
3. Quando si preparano le diluizioni dei campioni, pulire i puntali delle pipette prima di dispensare il siero nel diluente del campione. La presenza di un'eccessiva quantità di campione sulla parte esterna del puntale può alterare i risultati.
4. Si raccomanda l'uso di una pipetta multicanale poiché garantisce tempi di reazione, tempi d'incubazione e una dispensazione del reagente più uniformi.
5. **Un adeguato lavaggio dei pozzetti è estremamente importante.** Pozzetti non adeguatamente lavati mostreranno dei valori di fondo elevati e possono produrre risultati falsi positivi. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, quindi riempire ogni pozzetto con la soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione crociata dei pozzetti, specialmente durante il primo lavaggio eseguito dopo l'aspirazione. Far defluire tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui del tampone scuotendo i pozzetti con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e deflusso del tampone di lavaggio per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere battuti con vigore su della carta assorbente o su altro materiale assorbente per eliminare tutte le tracce del tampone di lavaggio. L'uso di un sistema automatico di lavaggio dei micropozzetti assicura una pulizia adeguata e uniforme ed è pertanto raccomandato.  
**NOTA:** a causa delle diverse tecniche di lavaggio e dei diversi sistemi automatici disponibili, il numero dei lavaggi può essere regolato per ottimizzare i risultati. Ogni laboratorio deve stabilire il numero di lavaggi che garantisca la maggiore efficacia al proprio sistema di lavaggio.
6. Un'inadeguata rimozione dei residui del tampone di lavaggio può causare uno sviluppo non uniforme del colore. Le strisce dei micropozzetti devono essere tamponate sulla carta o sulle salviette assorbenti per ridurre al minimo la presenza dei residui del tampone.
7. La tempistica di tutte le fasi è cruciale. Tutti i campioni di siero devono essere diluiti prima di avviare la procedura e devono essere dispensati nei micropozzetti nel più breve tempo possibile (non più di cinque minuti). Le dimensioni dei lotti devono essere stabilite in modo tale da consentire un'agevole manipolazione del campione entro questo lasso di tempo. L'uso di una pipetta multicanale facilita la manipolazione dei campioni e dei reagenti ed è pertanto raccomandato.

- Ad eccezione dell'ultima incubazione (soluzione di substrato), l'avvio di ogni fase d'incubazione avviene con il completamento della dispensazione del campione o del reagente. La fase d'incubazione della soluzione di substrato deve durare esattamente 30 minuti per ciascun pozzetto. Tutti i campioni e i reagenti devono essere dispensati nella stessa sequenza temporale e a intervalli regolari.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

### CALCOLI

#### Calcolo degli anticorpi anti-Sm/RNP

- Il Test RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-Sm/RNP rileva la presenza di anticorpi anti-Sm/RNP, anti-Sm e anti-RNP. I risultati di questo saggio in assenza di qualunque altro dato, devono essere riportati in termini di positività o negatività per gli anticorpi anti-Sm/RNP invece che gli anticorpi anti-Sm o anti-RNP presi singolarmente.
- Sottrarre il valore dell'assorbanza del pozzetto del reagente in bianco degli anticorpi anti-Sm/RNP dal valore dell'assorbanza ottenuto per gli anticorpi anti-Sm/RNP relativamente ai pozzetti del campione del paziente, della soluzione di calibrazione e di controllo. Calcolare i valori medi dell'assorbanza per i pozzetti in duplicato.
- Per ottenere il fattore di conversione, dividere la concentrazione anticorpale specifica del siero di calibrazione (riportata sull'etichetta) per il valore medio dell'assorbanza relativo ai pozzetti della soluzione di calibrazione.
- Per ottenere la concentrazione anticorpale specifica in Unità, moltiplicare i valori dell'assorbanza di ciascun campione per il fattore di conversione.
- La forma semplificata di questi calcoli può essere espressa come segue:

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

$U_c$  = Valore del calibratore (Unità)

$\lambda_c$  = Assorbanza del calibratore\*

$\lambda_s$  = Assorbanza del campione\*

$U_s$  = Valore del campione in Unità

\*Se i calibratori e i campioni sono analizzati in duplicato, utilizzare il valore medio dell'assorbanza.

#### Calcolo degli anticorpi anti-RNP

- Per poter ottenere un risultato positivo o negativo per gli anticorpi anti-RNP nel campione del paziente, il test RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-Sm/RNP deve essere eseguito in parallelo con il test RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-Sm nelle stesse condizioni d'esame e alla stessa diluizione del siero del paziente, effettuando i calcoli con i metodi descritti di seguito.

#### **Pozzetti rivestiti con l'antigene Sm**

- Sottrarre il valore dell'assorbanza del pozzetto del reagente in bianco dell'anticorpo anti-Sm dal valore dell'assorbanza ottenuto per gli anticorpi anti-Sm relativamente ai pozzetti del campione del paziente, della soluzione di calibrazione e del controllo positivo. Calcolare i valori medi dell'assorbanza per i pozzetti in duplicato.
- Per ottenere il fattore di conversione dell'antigene Sm, la concentrazione anticorpale specifica del siero di calibrazione degli anticorpi anti-Sm (riportata sull'etichetta) è divisa per il valore medio dell'assorbanza relativo ai pozzetti della soluzione di calibrazione degli anticorpi anti-Sm.
- Per ottenere la concentrazione specifica in Unità degli anticorpi anti-Sm, i valori dell'assorbanza di ciascun campione sono moltiplicati per il fattore di conversione dell'antigene Sm.

#### **Pozzetti rivestiti con l'antigene Sm/RNP**

- Sottrarre il valore dell'assorbanza del pozzetto del reagente in bianco degli anticorpi anti-Sm/RNP dal valore dell'assorbanza ottenuto per gli anticorpi anti-Sm/RNP relativamente ai pozzetti del campione del paziente, della soluzione di calibrazione e di controllo. Calcolare i valori medi dell'assorbanza per i pozzetti in duplicato.
- Per ottenere il fattore di conversione dell'antigene Sm/RNP, la concentrazione anticorpale specifica del siero di calibrazione degli anticorpi anti-Sm/RNP (riportata sull'etichetta) è divisa per il valore medio dell'assorbanza relativo ai pozzetti della soluzione di calibrazione degli anticorpi anti-Sm/RNP.
- Per ottenere la concentrazione specifica in Unità degli anticorpi anti-Sm/RNP, i valori dell'assorbanza di ciascun campione sono moltiplicati per il fattore di conversione dell'antigene Sm/RNP.

#### **Valore in Unità della concentrazione degli anticorpi anti-RNP**

- Per ottenere il valore in Unità degli anticorpi anti-RNP, sottrarre il valore in Unità della concentrazione degli anticorpi anti-Sm dal corrispondente valore degli anticorpi anti-Sm/RNP.

9. La forma semplificata di questi calcoli può essere espressa come segue:

$$1. \quad \frac{U_c \text{ SmRNP} \times \lambda_s \text{ SmRNP}}{\lambda_c \text{ SmRNP}} = U_s \text{ SmRNP}$$

$$2. \quad \frac{U_c \text{ SmRNP} \times \lambda_s \text{ SmRNP}}{\lambda_c \text{ Sm}} = U_s \text{ SmRNP}$$

$$3. \quad U_s \text{ SmRNP} - U_s \text{ Sm} = U_s \text{ RNP}$$

$U_c$  = Valore del calibratore (Unità)

$\lambda_c$  = Assorbanza del calibratore\*

$\lambda_s$  = Assorbanza del campione\*

$U_s$  = Valore del campione in Unità

\*Se i calibratori e i campioni sono analizzati in duplicato, utilizzare il valore medio dell'assorbanza.

### CONTROLLO DELLA QUALITÀ

1. Il valore medio dell'assorbanza dei pozzetti del calibratore deve essere pari ad almeno 0,400. Valori di assorbanza inferiori a 0,400 indicano un inadeguato sviluppo del colore e quindi un'analisi non valida. L'inadeguato sviluppo del colore è spesso causato dall'utilizzo di reagenti freddi o dall'impiego di tempi non corretti in una o più fasi del saggio. Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (18-24 °C) e ripetere l'analisi con particolare attenzione alla tempistica di tutte le fasi.
2. Il pozzetto della soluzione di controllo bianco deve avere un valore di assorbanza inferiore a 0,150. Valori d'assorbanza del bianco superiori a 0,150, sono indicativi di un lavaggio inadeguato o di una contaminazione dei reagenti.
3. I campioni con valori anticorpali specifici oltre il limite superiore del calibratore devono essere indicati come positivi, con un valore in Unità "maggiore o uguale" al valore in Unità riportato sull'etichetta del siero di calibrazione.
4. Il fattore di conversione deve essere calcolato per ogni sessione di analisi. L'utilizzo di un fattore di conversione derivato da un'altra sessione di analisi invaliderà i risultati.
5. Ciascun laboratorio deve stabilire e mantenere il proprio intervallo di valori di riferimento (range di normalità) sulla base della propria popolazione di pazienti e di altri fattori locali.
6. Il siero di controllo positivo è un siero umano contenente anticorpi anti-Sm e RNP. Questo è un controllo di tipo qualitativo che deve produrre un valore superiore a 20 Unità ENA.
7. Il siero di controllo negativo è un siero umano che non contiene anticorpi anti-Sm o RNP: Questo è un controllo di tipo qualitativo che deve produrre un valore inferiore a 20 Unità ENA.

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL PAZIENTE

I livelli degli anticorpi rilevati non hanno un significato clinico noto. Ciascun laboratorio deve stabilire il proprio intervallo di riferimento e i valori di cut-off sulla base della propria popolazione di pazienti esaminati. I valori in Unità sono influenzati dai fattori che riguardano il paziente, da considerazioni di tipo meccanico (ad esempio l'accuratezza e la precisione della pipettatura) e dalle condizioni del saggio (ad esempio temperatura e tempo delle fasi).

Risultati del test per la determinazione degli anticorpi anti-Sm/RNP

I valori in Unità ottenuti con questo saggio sono finalizzati semplicemente a suddividere i pazienti nelle due ampie categorie descritte di seguito: i pozzetti del campione del paziente che hanno prodotto valori superiori a 20 Unità ENA sono considerati positivi per gli anticorpi anti-Sm/RNP, i pozzetti del campione del paziente che hanno prodotto valori inferiori a 20 Unità ENA sono considerati negativi per gli anticorpi anti-Sm/RNP.

Risultati del test per la determinazione degli anticorpi anti-RNP

I pozzetti con gli antigeni Sm e Sm/RNP sono utilizzati insieme per stabilire la presenza di questi due autoanticorpi. Se il pozzetto con l'antigene Sm/RNP è positivo e il pozzetto dell'antigene Sm è negativo significa che il paziente ha anticorpi anti-RNP. Se entrambi i pozzetti sono positivi, con valori approssimativamente uguali, significa che il paziente ha anticorpi anti-Sm. Se entrambi i pozzetti sono positivi e il pozzetto dell'antigene Sm/RNP evidenzia un valore superiore di 30 Unità ENA o più a quello del pozzetto dell'antigene Sm, ciò è indicativo della presenza di autoanticorpi sia Sm sia RNP. Può essere difficile stimare l'attività dell'antigene RNP nei campioni che mostrano un'elevata positività sia del test dell'antigene Sm/RNP che Sm. Quando un campione evidenzia una forte positività (valore superiore a 100 Unità o un'assorbanza maggiore di 10) sia per l'antigene Sm sia per l'antigene Sm/RNP, la sottrazione del valore delle Unità dell'antigene Sm da quelle dell'Sm/RNP può produrre un risultato falso negativo per l'RNP. Si raccomanda pertanto di eseguire nuovamente il test sui campioni fortemente positivi (>100 Unità) sia

per l'antigene Sm/RNP sia per l'Sm ad un'ulteriore diluizione di 1/10 e 1/20 (nel diluente del campione) al fine di determinare se l'attività dell'Sm/RNP è maggiore di quella dell'Sm. I calcoli devono essere effettuati sulla stessa diluizione del campione del paziente. In alternativa, la presenza di entrambi gli anticorpi può essere confermata utilizzando il Sistema di analisi AUTO-ID® ad immunodiffusione, numero di catalogo 6030.

Poiché nei pazienti con LES e in altre sindromi autoimmuni si osservano comunemente sieri con più specificità anticorpali, un singolo siero può evidenziare una reazione positiva a più di un anticorpo.

## DEFINIZIONE DEI RISULTATI

I risultati devono essere definiti come positivi o negativi per gli anticorpi contro l'antigene Sm/RNP, Sm (Smith) e RNP. I livelli degli anticorpi non hanno un significato clinico noto.

## RISULTATI PREVISTI

L'incidenza degli autoanticorpi ai vari antigeni nucleari varia in relazione alla popolazione di pazienti e all'incidenza delle patologie reumatiche all'interno della stessa. Nella Tabella 1 è riportata in sintesi l'associazione degli anticorpi con specifiche malattie reumatiche

**Tabella 1**

<b>Anticorpi contro:</b>	<b>Malattia associata:</b>
Sm	Anticorpo marcatore ad alta specificità osservato nel 25-30% dei pazienti con LES.
U1-RNP	Connettivite mista: >95%, LES: 35%. Frequenza inferiore nel lupus discoide o nella sclerosi sistemica progressiva.

## INTERVALLO DI RIFERIMENTO

L'intervallo di riferimento è stato stabilito tramite il test sierico di 206 donatori sani, 105 femmine e 101 maschi nessuno dei quali presentava una storia clinica corrente o pregressa di patologie reumatiche. Oltre a ciò sono stati ricavati dati da 143 pazienti reumatici con anticorpi ad uno o più degli antigeni di questo saggio ma con negatività per gli anticorpi anti-Sm e RNP. In base a questi dati, il valore di cut-off normale è stato identificato come inferiore a 20 Unità ENA.

## LIMITI DEL TEST

1. La diagnosi non può essere effettuata sulla base del solo rilievo degli anticorpi diretti contro gli antigeni nucleari estraibili. Il medico deve interpretare tali risultati congiuntamente all'anamnesi del paziente e alla sua sintomatologia, ai reperti di carattere obiettivo e agli esiti delle altre procedure diagnostiche.
2. La terapia non deve essere avviata unicamente sulla base della positività del test per gli anticorpi diretti contro gli antigeni nucleari estraibili. Prima di iniziare la terapia, è necessario prendere in considerazione le indicazioni cliniche, altri risultati di test di laboratorio e la valutazione clinica del medico.
3. Alcuni pazienti con patologie autoimmuni possono presentare livelli insignificanti o non rilevabili di autoanticorpi agli antigeni nucleari estraibili, mentre in alcuni soggetti i livelli anticorpali possono essere elevati, ma associarsi ad una nulla o scarsa evidenza clinica della malattia. Il medico deve interpretare i risultati di tali test congiuntamente all'anamnesi del paziente e alla sua sintomatologia, ai reperti di carattere obiettivo e agli esiti delle altre procedure diagnostiche.
4. I livelli anticorpali determinati con questo sistema di analisi non sono necessariamente indicativi della gravità o della durata della malattia.

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il test RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-Sm/RNP della Immuno Concepts è stato comparato con il test RELISA® per lo screening degli anticorpi anti-ENA sempre della Immuno Concepts. La popolazione di pazienti studiata consisteva di 62 soggetti rispondenti ai criteri diagnostici per il LES, 28 soggetti con miosite autoimmune o sindromi da sovrapposizione con miosite, 24 con sclerosi sistemica o sclerosi sistemica progressiva, 26 con sindrome di Sjögren e 3 con artrite reumatoide. Sulla base di questo confronto, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

**Tabella 2 Rilevamento degli anticorpi contro l'antigene Sm.**

		Test RELISA® per lo screening degli anticorpi anti-ENA Immuno Concepts	
		Positivo	Negativo
Test RELISA® per il rilevamento degli anticorpi anti-Sm della Immuno Concepts	Positivo	36	0
	Negativo	0	107

Questi esiti producono i seguenti risultati: sensibilità relativa del 100 %, specificità relativa del 100% ed equivalenza complessiva del 100 %.

**Tabella 3 Rilevamento degli anticorpi contro l'autoantigene RNP**

		Test RELISA® per lo screening degli anticorpi anti-ENA Immuno Concepts	
		Positivo	Negativo
Test RELISA® per il rilevamento degli anticorpi anti-Sm della Immuno Concepts	Positivo	45	0
	Negativo	0	98

Questi esiti producono i seguenti risultati: sensibilità relativa del 100 %, specificità relativa del 100 % ed equivalenza complessiva del 100 %.

#### **REATTIVITÀ CROCIATA**

Sette campioni sono stati utilizzati per lo studio della reattività crociata. Essi sono stati ben caratterizzati tramite Western Blo, CIE (controimmuno-elettroforesi) e immunodiffusione come sieri monospecifici per ciascuno degli autoanticorpi del test RELISA® per lo screening degli ENA. In nessuno dei campioni è stata rilevata traccia di reattività crociata. Vedere la Tabella 4

**Tabella 4**

Campione	Antigene Sm	Antigene Sm/RNP
<b>Anti-Sm</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>
<b>Anti-RNP</b>	<b>Neg</b>	<b>Pos</b>
<b>Anti-Sm/RNP</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>
<b>Anti-SS-A</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
<b>Anti-SS-B</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
<b>Anti-Scl-70</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
<b>Anti-Jo-1</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>

#### **RIPRODUCIBILITÀ**

Sono stati esaminati sei campioni su tre lotti distinti di strisce di antigeni in tre diverse occasioni. Due dei campioni si sono rivelati negativi, ma con valori vicini al valore di cut off di 20 Unità ENA, due campioni si sono dimostrati positivi, ma con vicini al valore di cut-off di 20 Unità ENA e due campioni di sono rivelati chiaramente positivi con valori superiori alle 30 Unità ENA. I campioni negativi non hanno dato mai risultati positivi e i campioni positivi hanno prodotto coerenti risultati positivi.

# BIBLIOGRAFIA

- Douvas, A.S., Achten, M., and Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *J. Biol. Chem.* 254:10514-10522, 1979.
- Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M.J., et al. Autoantibodies to Centromere (Kinetochores) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1627-1631, 1980.
- Cohen, M.L., Dawkins, B., Dawkins, R.L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
- Sharp, G.C., Irwin, W.S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52:148-159, 1972.
- Sharp, G.C., Irwin, 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 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.
- von Mühlen, C.A. and Tan, E.M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. *Sem. Arthritis Rheum.* 24:323-358, 1995.
- Lerner, M.R. and Steitz, J.A. Antibodies to Small Nuclear RNAs Complexed with Proteins are Produced by Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5495-5499, 1979.
- Conner, G.E., Nelson, D., Wisniewski, R., et al. Protein Antigens of the RNA-protein Complexes Detected by Anti-Sm and Anti-RNP Antibodies Found in Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Related Disorders. *J. Exp. Med.* 156:1475-1485, 1982.
- Notman, D.D., Kurata, N., and Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Intern. Med.* 83:464-469, 1975.
- Tan, E.M. Antinuclear Antibodies in Diagnosis and Management. *Hosp. Pract.* 18:78-84, 1983.

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



Produttore



Rappresentante autorizzato per la UE



Limite temperatura



Contenuto sufficiente per n. test



Consultare le Istruzioni per



Dispositivo medico diagnostico in vitro



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover, Germania



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827  
Assistenza tecnica USA: 1.800.251.5115 Fuori dagli USA: 1.916.363.2649  
Email: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

Cat 7096-09.Sm-RNP-I

4.11.02.003.128-It

Rev 1.0 © Copyright 2011

## Direttiva sui dispositivi diagnostici in vitro (IDV) 2001/59/CE – Frasi di pericolo



**REF 7035: Soluzione di substrato**

<b>R23/ 24/ 25</b>	Tossico per inalazione, a contatto con la pelle e per ingestione.
<b>R39/ 23/ 24/ 25</b>	Tossico: pericolo di effetti irreversibili molto gravi per inalazione, a contatto con la pelle e per ingestione.
<b>S1/2</b>	Conservare sotto chiave e fuori della portata dei bambini.
<b>S7</b>	Conservare il recipiente perfettamente chiuso.
<b>S36/ 37</b>	Indossare un indumento di protezione e guanti adeguati.
<b>S45</b>	In caso d'infortuni o di malore, consultare immediatamente un medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

# PROCEDURA DEL TEST RELISA® PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-SM/RNP

**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 FOGLIO DI LAVORO**  
Etichettare il foglio di lavoro incluso nel kit per indicare la posizione dei campioni in ciascuna striscia da otto micropozzetti. Analizzare il calibratore in duplicato. Un pozzetto è utilizzato per il bianco del reagente. Raccomandiamo di analizzare in duplicato ciascun campione del paziente e ciascun controllo fin quando non si è raggiunta un'accettabile precisione dell'analisi all'interno del proprio laboratorio.
- 2. PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE TAMPONE DI LAVAGGIO (PBS-Tween)**  
Sciogliere il contenuto di una busta della polvere del tampone PBS in un litro di acqua deionizzata o distillata. Aggiungere l'intero contenuto di un flacone di concentrato per tampone di lavaggio al contenitore da un litro in cui è stato disciolto il tampone PBS. Mescolare bene. La soluzione tampone di lavaggio può essere coperta e conservata a 2-10 °C fino a quattro settimane.
- 3. DILUIZIONE DEL CAMPIONE DEL PAZIENTE**  
Diluire il campione del paziente a 1:40 aggiungendo 25 µl di siero a 975 µl di diluente per campioni. Mescolare bene. Il controllo positivo e negativo e il calibratore sono forniti alla diluizione di lavoro e non ne richiedono una ulteriore.
- 4. PREPARAZIONE DELLE STRISCE DEI MICROPOZZETTI**  
Estrarre il numero necessario di strisce di micropozzetti dalla busta. I micropozzetti devono essere saldamente collocati sul supporto. Premere con forza su entrambe le estremità delle strisce in modo che si fissino sul supporto. I pozzetti che sono stati adeguatamente inseriti non cadono quando il supporto viene capovolto. Le strisce non utilizzate possono essere reintrodotte nella busta dotata di chiusura sigillante a zip e conservate in frigo fino ad un massimo di 45 giorni.
- 5. DISPENSAZIONE DELLE DILUIZIONI DEL SIERO**  
Dispensare 100 µl dei calibratori, dei controlli e dei campioni diluiti del paziente nei pozzetti appropriati, come descritto foglio di lavoro. Dispensare 100 µl del diluente del campione nel pozzetto bianco del reagente.
- 6. INCUBAZIONE DELLE STRISCE (30 minuti a temperatura ambiente ovvero 18-24 °C)**  
Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Durante l'incubazione i pozzetti devono essere protetti da correnti d'aria o variazioni di temperatura. Se si vuole, i pozzetti possono essere coperti con della pellicola trasparente o salviette di carta per proteggerli dalla polvere e da altri corpi estranei.
- 7. LAVAGGIO DELLE STRISCE (vedere la Note procedurali generali 5 e 6)**  
Lavare i pozzetti 3-5 volte con la soluzione tampone di lavaggio PBS-Tween. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, quindi riempire ogni pozzetto con la soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione crociata dei pozzetti, specialmente durante il primo lavaggio eseguito dopo l'aspirazione. Far defluire tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui del tampone scuotendo i pozzetti con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e deflusso del tampone di lavaggio per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere battuti con vigore su della carta assorbente o su altro materiale assorbente per eliminare tutte le tracce del tampone di lavaggio.
- 8. DISPENSAZIONE DEL REAGENTE ANTICORPO ENZIMATICO**  
Dispensare 100 µl del reagente anticorpo enzimatico in ciascuno dei pozzetti.
- 9. INCUBAZIONE DELLE STRISCE (30 minuti a temperatura ambiente ovvero 18-24 °C)**  
Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Durante l'incubazione le strisce devono essere protette da correnti d'aria o variazioni di temperatura. Se si vuole, le strisce possono essere coperte con della pellicola trasparente o delle salviette di carta per proteggerle dalla polvere e da altri corpi estranei.
- 10. LAVAGGIO DELLE STRISCE**  
Lavare i pozzetti 3-5 volte con la soluzione tampone di lavaggio PBS-Tween. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, quindi riempire ogni pozzetto con la soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione crociata dei pozzetti, specialmente durante il primo lavaggio eseguito dopo l'aspirazione. Far defluire tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui del tampone scuotendo i pozzetti con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e deflusso del tampone di lavaggio per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere battuti con vigore su della carta assorbente o su altro materiale assorbente per eliminare tutte le tracce del tampone di lavaggio.
- 11. DISPENSAZIONE DELLA SOLUZIONE DI SUBSTRATO**  
Usando un timer per garantire l'uniformità degli intervalli di tempo, dispensare 100 µl della soluzione di substrato in ciascuno dei pozzetti. La soluzione di substrato deve essere aggiunta ai pozzetti ad intervalli regolari in modo che ogni pozzetto sia incubato esattamente per il medesimo tempo (30 minuti). La soluzione di substrato dei pozzetti incubati con campioni positivi si colorerà di blu, mentre la soluzione dei pozzetti incubati con campioni negativi sarà incolore o assumerà una colorazione blu molto chiaro.
- 12. INCUBAZIONE DELLE STRISCE (esattamente 30 minuti a temperatura ambiente ovvero 18-24 °C)**  
Incubare a temperatura ambiente per esattamente 30 minuti. Durante l'incubazione le strisce devono essere protette da correnti d'aria o variazioni di temperatura.
- 13. DISPENSAZIONE DEL REAGENTE BLOCCANTE**  
Dopo che il primo pozzetto è stato incubato esattamente per 30 minuti, aggiungere 100 µl del reagente bloccante in ciascun pozzetto, nello stesso ordine e ai medesimi intervalli di tempo della soluzione di substrato. Al momento dell'aggiunta del reagente bloccante, la soluzione di substrato blu virerà al giallo e la soluzione incolore resterà tale.
- 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 sono letti a 450 nm rispetto al pozzetto del bianco del reagente. Se è disponibile uno spettrofotometro a doppia lunghezza d'onda, la lunghezza d'onda per il filtro di riferimento deve essere di 600-650 nm. La lettura dei micropozzetti senza un filtro di riferimento produrrà valori di assorbanza più elevati.

**PER ASSISTENZA TECNICA CONTATTARE:**

USA: 1-800-251-5115 Fuori degli USA: 1-916-363-2649

Email: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)