



# Immuli<sup>TM</sup> Anti-Ribonucleic Acid Antibody (RNA) ELISA

IVD

PRODUCT INSERT

Product Code: 1166    anti-RNA    96 Determinations

## INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and semi-quantitation of antibodies to ribonucleic bands in serum of patients with collagen-vascular disorders.

## SUMMARY AND EXPLANATION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multi-faceted autoimmune disease characterized by the presence of a variety of circulating autoantibodies<sup>1,2</sup>. Central nervous system (CNS) manifestations occur in a significant number of all SLE patients<sup>3</sup> and elicit behavioral abnormalities resembling schizophrenia<sup>4</sup>. However, there is no single diagnostic test available, that can detect CNS manifestations of lupus with consistent sensitivity and specificity.

Bluestein et al<sup>5</sup> have demonstrated an association between cerebral lupus and cytotoxic antibodies in the cerebrospinal fluid against a neuroblastoma cell line. In patients with psychotic SLE, a group of autoantibodies is targeted against the ribosomal phosphoproteins, called Po (38kD), P1 (19kD), and the P2 (17kD)<sup>6</sup>. Preceding the onset of psychotic episodes in these patients, there is a selective elevation of anti-ribosomal P antibodies<sup>7</sup>. Similarly RNA antibodies also occur in SLE and the frequency may vary from 17-80%<sup>8</sup>. In addition, a correlation between anti-RNA antibodies and disease activity has also been reported<sup>9</sup>. In some patients anti-ribosomal P and anti-RNA antibodies may coexist<sup>10</sup>. Sera containing anti-ribosomal P and RNA antibodies invariably show a strong cytoplasmic immunofluorescence pattern on HEp-2 cells and mouse kidney substrate sections due to the ribosomal and cytoplasmic distribution of these antigens.

Anti-RNA antibodies occur in a significant number of patients with collagen-vascular disorders. These antibodies are difficult to recognize by indirect immunofluorescence. The Immuli<sup>TM</sup> anti-RNA test represents a significant technological advance and offers a sensitive and specific serological method to assess these patients.

## PRINCIPALS OF THE PROCEDURE

The ELISA is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with ribonucleic acid. Controls, calibrators and patient sera are incubated in the coated microwells, allowing specific antibodies present in the serum to bind to the antigen.

Unbound antibodies and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are incubated with an enzyme labeled anti-human IgG conjugate. Unbound conjugate is removed by washing.

Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of pNPP substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in Enzyme Units per milliliter (EU/ml).

## REAGENTS

### Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell strips are for one time use only.

## Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>17</sup>.

**WARNING** - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

**Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results.** Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from IMMCO DIAGNOSTICS.

Use good laboratory techniques to minimize microbial and chemical contamination. Do not use after expiration date.

## Materials provided

ImmuLisa™ Anti-RNA ELISA **REF** 1166

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	<b>MICROPLATE RNA</b>	<b>Microplate</b> with individual breakaway microwells coated with RNA antigen.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR A RNA</b> *	Ready to use <b>Calibrator A</b> ( <i>green cap</i> ). Human serum containing antibodies to RNA.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR B RNA</b> *	Ready to use <b>Calibrator B</b> ( <i>violet cap</i> ). Human serum containing antibodies to RNA.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR C RNA</b> *	Ready to use <b>Calibrator C</b> ( <i>blue cap</i> ). Human serum containing antibodies to RNA.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR D ACA</b> *	Ready to use <b>Calibrator D</b> ( <i>yellow cap</i> ). Human serum containing antibodies to RNA.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + RNA</b> *	Ready to use <b>Positive Control</b> ( <i>red cap</i> ). Contains human serum positive for RNA.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Ready to use <b>Negative Control</b> ( <i>white cap</i> ). Contains human serum.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ ALKPHOS</b> *	Ready to use <b>anti-human Alk. Phos. Conjugate</b> . Color coded pink.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Ready to use <b>Serum Diluent</b> . Color coded blue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Ready to use <b>Enzyme Substrate</b> . Contains pNPP. <b>Protect from light.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Ready to use <b>Stop Solution</b> .
2	<b>BUF WASH</b>	Powder <b>Wash Buffer</b> . Reconstitute to one liter each.

\* Contains < 0.1% NaN<sub>3</sub>

## Materials Required But Not Provided

- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Deionized or distilled water
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Timer
- Absorbent paper
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

## SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

## PROCEDURE

### Procedural Notes

- Before starting the assay read these instructions carefully.
- Bring all reagents and samples to room temperature (20-26°C) for 30 minutes. Return materials to refrigerator immediately after use.
- Prepare all dilutions of the patient specimens before starting the test.
- **Immediately return unused strips to the pouch containing desiccants and seal securely to minimize exposure to water vapor.**
- Wash step: Good technique is critical. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- Careful timing is important. Incubation periods begin after dispensing reagents.

### Assay procedure

1. Let all reagents and specimens equilibrate at room temperature.
  2. Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
  3. For a **qualitative determination** use only the Ready to Use Low Calibrator D (*vial with yellow cap*).
- or For a **semi-quantitative determination** use the Ready to Use Calibrators A through D as depicted in the sample layout below.

#### QUALITATIVE DETERMINATION

A	BLANK	S5	○	○
B	NEG	S6	○	○
C	POS	S7	○	○
D	CAL D	S8	○	○
E	S1	S9	○	○
F	S2	S10	○	○
G	S3	S11	○	○
H	S4	S12	○	○
	1	2	3	4

#### SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

A	BLANK	S2	○	○
B	NEG	S3	○	○
C	POS	S4	○	○
D	CAL A	S5	○	○
E	CAL B	S6	○	○
F	CAL C	S7	○	○
G	CAL D	S8	○	○
H	S1	S9	○	○
	1	2	3	4

4. Prepare a **1:400** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **1.0 ml** of Serum Diluent to get a **1:200** dilution. In a separate tube, dilute (**1:2**) the **1:200** dilution of the sera by mixing **150 µl** of the **1:200** dilution with **150 µl** of the Serum Diluent to get a final dilution of **1:400**.
5. Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder .
6. Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:400**) to the appropriate microwells as per protocol sheet.  
**Note:** Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
7. Incubate **30 minutes** ( $\pm 5$  min) at room temperature.
8. Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
9. Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
10. Incubate **30 minutes** ( $\pm 5$  min) at room temperature.
11. Wash all microwells as in Step 8.
12. Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
13. Incubate **30 minutes** ( $\pm 5$  min) at room temperature.
14. Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within 1 hour from adding Stop Solution.
15. Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or 405/630nm dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

**Quality Control**

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <20 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations the positive control must give values in the range stated on the vial.

**RESULTS**

**Calculations**

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. **QUALITATIVE DETERMINATION**

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{EU/ml of Calibrator D} = \text{EU/ml Test Sample}$$

2. **SEMI-QUANTITATIVE METHOD**

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient

samples from the curve against its corresponding absorbance value.

### **Calibrator**

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such serum sample should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

### **Interpretation**

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. The values depicted below were determined by testing 61 normal blood donors and represent the mean of the normals plus 3SD. Each laboratory must determine its own normal values.

<b>Anti-RNA values</b>	<b>Interpretation</b>
<20 EU/ml	Negative
20-25 EU/m	Borderline
>25 EU/ml	Positive

### **LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

Test results obtained by this assay alone, are not diagnostic and should be considered in conjunction with the clinical presentation of the patient.

### **EXPECTED VALUES**

Expected values in a normal population are negative. The incidence of anti-RNA antibodies vary and have been reported in 17-80% of patients with SLE and in a significant number of patients with scleroderma. Table 1 was abstracted from a study by Blanco et al<sup>9</sup> and appears at the end of this document.

### **Precision:**

Two anti-RNA positive sera were tested with the IMMCO Anti-RNA ELISA to determine inter- and intra-assay variability. The results appear in Table 2 at the end of this document. The Figure 1 at the end of this document depicts the incidence of anti-RNA antibodies in normal population with the IMMCO anti-RNA ELISA.

### **Recovery:**

Samples with known anti-RNA antibody concentrations were mixed with appropriate dilutions of another positive sample with known amounts. Anti-RNA antibody levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery calculated. The results appear in Table 3 at the end of this document.



# ImmuLisa™ Anti-Acido Ribonucleico (RNA) Anticorpo ELISA

IVD

REF Code: 1166

anti-RNA

96 determinazioni

Queste analisi è un test immunoenzimatico per la ricerca semi-quantitativa di anticorpi ai RNA in siero umano dei pazienti con malattie collagene-vascolare.

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il lupus eritematoso sistemico (SLE) è una malattia autoimmune caratterizzata dalla presenza di parecchi autoanticorpi circolanti<sup>1,2</sup>. Le manifestazioni del sistema nervoso centrale (CNS) si presentano in un numero significativo di pazienti<sup>3</sup> di SLE e traggono le anomalie fuori del comportamento che assomigliano alla schizofrenia<sup>4</sup>. Tuttavia, non ci è prova diagnostica che può rilevare le manifestazioni dello CNS di SLE con la sensibilità e la specificità costanti.

Bluestein ed altri<sup>5</sup> hanno dimostrato un'associazione fra il lupus cerebrale e gli anticorpi citotossici nel liquido cerebrospinale contro una cellula di neuroblastoma allinearsi. In pazienti con SLE psicotico, un gruppo degli anticorpi è designato contro le fosfoproteine ribosomal il Po (38kD), P1 (19kD) ed il P2 (17kD)<sup>6</sup>. Precedendo l'inizio degli episodi psicotici in questi pazienti, ci è un'altezza selettiva degli anticorpi anti-ribosomal P<sup>7</sup>.

Gli anticorpi del RNA inoltre si presentano in SLE e la frequenza può variare da 17-80%<sup>8</sup>. In più, una correlazione fra gli anticorpi del anti-RNA e l'attività di malattia inoltre è stata segnalata<sup>9</sup>. In alcuni pazienti gli anticorpi anti-ribosomal P e anti-RNA P possono coesistere<sup>10</sup>. I sieri che contengono gli anticorpi anti-ribosomal P e anti-RNA mostrano invariabilmente un modello citoplasmico forte di immunofluorescenza sui cellule di HEp-2 e sulle sezioni del substrato del rene del mouse dovuto la distribuzione ribosomal e citoplasmica di questi antigeni.

Gli anticorpi anti-RNA si presentano in un numero significativo di pazienti con i disordini collagene-vascolari. Questi anticorpi sono difficili da riconoscere dall'immunofluorescenza indiretta. La prova anti-RNA rappresenta un progresso tecnologico significativo ed offre un metodo sierologico sensibile e specifico per valutare questi pazienti.

## PRINCIPIO DELLA METODICA

L'antigene RNA è adsorbito sulla parete dei pozzetti di una piastra microtiter di polistirene. La piastra è ostruita per ridurre le reazioni di non-specifico. I controlli, I calibratori, i sieri diluiti dei pazienti vengono distribuiti nei pozzetti corrispondenti, consentendo agli anticorpi anti-RNA eventualmente presenti di legarsi all'antigene adsorbito. L'eccesso di campione non legato viene allontanato mediante il lavaggio e successivamente si aggiunge a ciascun pozzetto un anticorpo umano marcato con un enzima. Questo l'enzima ha coniugato gli anticorpi si lega specificamente all'immunoglobulina umana. Dopo ulteriore lavaggio per allontanare l'eccesso di anticorpi umane marcati con l'enzima, il substrato enzimatico specifico (pNPP) allora è aggiunto ai pozzetti. Dopo aver interrotto la produzione enzimatica del prodotto colorato si determina la presenza o l'assenza di anticorpi anti-RNA confrontando la densità ottica del campione con quella di una curva di calibrazione standard a 4 punti. I risultati sono riportati in modo semi-quantitativo in unità degli enzimi (EU/ml).

## REAGENTI

### Condizioni di conservazione

Conservare tutti i reagenti del kit a 2-8°C. Non congelare. I reagenti sono stabili fino alla data

di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.

Non usare se il reagente non è chiaro.

Tampone di lavaggio: Aggiungere l'acqua distillata o deionizzata per il volume del 1L.

Microstrips: Usare una volta soltanto.

### Precauzioni

Tutte le fonti umane di materiali usati nella preparazione dei controlli per questo prodotto sono state testate e sono risultate negative per la presenza di anticorpi anti-HIV, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV mediante metodi approvati dall'FDA. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

La sodio azide è usata come conservante. La sodio azide è un veleno e può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Lasciar scorrere grandi quantità di acqua, se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, per prevenire la formazione di azidi.

La sostituzione di componenti diversi da quelli forniti nel kit può causare risultati non attendibili. Usare le buone tecniche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare dopo la data di scadenza.

### Materiali forniti

ImmuLisa™ anti-RNA ELISA **REF** 1166

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	<b>MICROPLATE RNA</b>	microstrips da 96 pozzetti individuali con antigene RNA
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR A RNA</b> *	calibratore A (protezione verde), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR B RNA</b> *	calibratore B (protezione viola), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR C RNA</b> *	calibratore C (protezione blu), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR D RNA</b> *	calibratore D (protezione gialla), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + RNA</b> *	controllo positivo (protezione rossa), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	controllo negativo (protezione bianca), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ ALKPHOS</b> *	coniugato fos. alc. Colore rosa codificato colore.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	diluyente per campioni. Colorare l'azzurro codificato.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	substrato enzimatico. Contiene il pNPP. <b>Proteggere da luce.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	soluzione bloccante
2	<b>BUF WASH</b>	tampone di lavaggio per 1 litro/fiala

\* Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub>

### Materiali richiesti ma non forniti

- Micropipette in grado di erogare volume di 5 – 1000 µL
- Puntali monouso per micropipette
- Provette per la diluizione dei sieri, volume 4mL
- Acqua distillata o deionizzata

- Lettore per piastre ELISA in grado di leggere a 405nm
- Bottiglia per tampone di lavaggio
- Temporizzatore
- Carta assorbente

### Raccolta dei campioni

Questa tecnica deve essere usata con un campione di siero. Campioni con segni di contaminazione microbica, trattati con calore o contenenti particelle visibili non dovrebbero essere usati. Si dovrebbe evitare anche l'uso di sieri fortemente emolizzati o lipemici.

Conservare i campioni a temperatura ambiente per non più di 8 ore. Se il test non può essere eseguito entro 8 ore, conservare i campioni in frigorifero a 2-8°C. Se il test non può essere eseguito entro 48 ore, oppure per la spedizione dei campioni, congelare a -20°C. Evitare il congelamento ripetuto e lo scioglimento.

### METODICA

#### Prima di incominciare

- Prima di cominciare l'analisi ha letto con attenzione queste istruzioni.
- Portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (20-26°C) per 30 minuti. Materiali di ritorno al frigorifero subito dopo di uso.
- Preparare tutte le diluzioni degli esemplari pazienti prima di iniziare la prova.
- **Rimettere immediatamente la strisce inutilizzate nella busta contenente il materiale essiccante e sigillarla bene per minimizzare l'esposizione all'umidità ambientale.**
- Lavaggio: La buona tecnica è critica. Una rondella automatizzata del piastra microtiter ELISA è suggerita.
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di trasporto delle 8 posizioni simultaneamente. Ciò accelera il processo e provvede ad un più tempo di incubazione dell'uniforme.
- La sincronizzazione attenta è importante. I periodi di incubazione cominciano dopo l'erogazione del reagentes.

#### Esecuzione del test

1. **TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) PRIMA DI INIZIARE IL TEST.**
2. Usare l'annotazione di protocollo per notare la posizione degli esemplari nel piastra microtiter. È buona pratica del laboratorio verificare gli esemplari due volte.
3. **Determinazione qualitativa:** usare soltanto Calibratore D.  
**Determinazione semi-quantitativa:** usare Calibratori A - D come indicato nell'esempio qui sotto.

**Determinazione qualitativa:**

A	BLANK	S5	○	○
B	NEG	S6	○	○
C	POS	S7	○	○
D	CAL D	S8	○	○
E	S1	S9	○	○
F	S2	S10	○	○
G	S3	S11	○	○
H	S4	S12	○	○
	1	2	3	4

**Determinazione semi-quantitativa:**

A	BLANK	S2	○	○
B	NEG	S3	○	○
C	POS	S4	○	○
D	CAL A	S5	○	○
E	CAL B	S6	○	○
F	CAL C	S7	○	○
G	CAL D	S8	○	○
H	S1	S9	○	○
	1	2	3	4

4. Preparare una diluzione di **1:400** dei campioni mescolando **5 µl** dei campioni con **1.0 ml** di diluente per campioni. Per una diluzione di **1:200**. In un tubo separato, diluire (**1:2**) la diluzione di **1:200** dei sieri mescolando **150 µl** della diluzione di **1:200** con **150 µl** del diluente del siero per ottenere una diluzione finale di **1:400**.
  5. Distribuire 100 µL di ciascuno dei calibratori, dei campioni diluiti, del Controllo Negativo e del Controllo Positivo nei pozzetti corrispondenti.
- Nota:** Includere una posizione con **100 µl** del diluente per campioni come spazio in bianco del reagente. Il valore zero del lettore del piastra microtiter dovrebbe essere regolato usando questa posizione. La capacità di assorbimento di questo pozzetto non dovrebbe essere più grande di 0.3.
6. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente su una superficie piana.
  7. Lavaggio: Aspirare completamente il contenuto di ciascun pozzetto. Distribuire 200-300µL di soluzione di lavaggio in tutti i pozzetti e quindi aspirarla. Ripetere questa operazione per altre tre volte, per un totale di quattro lavaggi. Dopo l'ultimo lavaggio capovolgere la piastra e scuoterla fermamente su tovaglioli di carta assorbente per rimuovere eventuali residui di liquido. Non asciugarsi pozzetti completamente.
  8. Distribuire 100µL di Coniugato in ciascun pozzetto.
  9. Incubare i pozzetti per 30 minuti.
  10. Lavaggio: Ripetere la procedura descritta al punto 7.
  11. Distribuire 100µL di substrato enzimatico in ciascun pozzetto
  12. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
  13. Distribuire 100µL di soluzione bloccante in ogni pozzetto. Per l'aggiunta della soluzione bloccante mantenere la stessa sequenza e gli stessi tempi utilizzati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza (OD) entro 1 ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.
  14. Leggere l'assorbanza (OD) di ciascun pozzetto a 405nm usando un singolo o lettore doppio del piastra microtiter di lunghezza d'onda contro l'insieme in bianco del reagente alla capacità di assorbimento zero.

## RISULTATI

### Calcolo dei risultati

Le concentrazioni dei campioni pazienti possono essere determinate da uno di due metodi:

#### 1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

**OD di Esemplare**

$$\frac{\text{OD di Esemplare}}{\text{OD di Calibratore D}} \times \text{EU/ml de Calibratore D} = \text{EU/ml di Esemplare}$$

#### 2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Capacità di assorbimento del diagramma di calibratores da A a D contro la loro concentrazione rispettiva su una carta da grafico lineare-lineare. Tracciare la concentrazione EU / ml sull'X-asse contro la capacità di assorbimento sull'Y-asse e disegnare la curva adatta migliore. Determinare le concentrazioni dei campioni pazienti dalla curva contro il relativo valore corrispondente di capacità di assorbanza.

#### **Calibratore**

I calibratori sono inclusi per fornire semi - la quantificazione e devono essere usati con ogni prova. Gli esemplari pazienti che contengono i livelli elevati dell'anticorpo possono dare i valori di capacità di assorbanza più grandi di quello del calibratore A. Per che determina i valori semiquantitativi esatti tali esemplari dovrebbe più ulteriormente essere diluito in modo da fanno parte della gamma della curva del calibratore una volta riprovati. Per determinazione EU / ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluzione.

## Interpretazione

Le seguenti informazioni servono soltanto da guida nell'interpretazione dei risultati del laboratorio. Ogni laboratorio deve determinare i relativi propri valori normali.

Anti-RNA	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

## LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

I risultati della prova ottenuti da questa analisi da solo non sono diagnostici e dovrebbero essere considerati insieme con la presentazione clinica del paziente.

## VALORI PREVISTI

I valori previsti in una popolazione normale sono negativi. L'incidenza degli anticorpi del anti-RNA varia ed è stata segnalata in 17-80% dei pazienti con SLE ed in un numero significativo di pazienti con la dermatosclerosi. La tabella 1 (come l'estremità di questo documento) è stata sottratta da uno studio da Blanco ed altri <sup>8</sup>.

## CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONI

### Precisione:

Due sieri positivi del anti-RNA sono stati esaminati con il ELISA Anti-RNA di IMMCO per determinare la variabilità intra- ed inter -analisi. I risultati compaiono in tabella 2 all'estremità di questo documento.

Figura 1 all'estremità di questo documento descrive l'incidenza degli anticorpi del anti-RNA in popolazione normale con il ELISA anti-RNA di IMMCO.

### Recupero:

I campioni con le concentrazioni conosciute nell'anticorpo anti-RNA sono stati mescolati con le diluzioni adatte di un altro campione positivo con gli importi conosciuti. I livelli dell'anticorpo anti-RNA dei campioni misti sono stati determinati e dai valori ha ottenuto il recupero di percento calcolato. I risultati compaiono in tabella 3 all'estremità di questo documento.

## REFERENCÉS•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI

1. Christian CL, Elkon KB. Autoantibodies to intracellular proteins: clinical and biologic significance. *Am J Med*; 1986, 80:53-61.
2. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*; 1996, 45:1732-1740.
3. Estes D, Christian CL. The natural history of systemic lupus erythematosus by prospective analysis. *Medicine (Baltimore)*; 1971, 50:85-95.
4. Feinglass EJ, Amett FC, Dorsch CA, Zizic Stevens MB. Neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus: diagnosis, clinical spectrum, and relationship to other features of the disease. *Medicine (Baltimore)*; 1976, 55:323-39.
5. Bluestein HG, Williams GW, Steinberg AD. Cerebrospinal fluid antibodies to neuronal cells: association with neuropsychiatric manifestations of SLE. *Am J Med*; 1981, 70:240-246.
6. Elkon KB, Parnassa AP, Foster CL. Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J Exp Med*; 1985, 162:459-471.
7. Bonfa E, Golombek SJ, Kaufman LD and Elkon KB. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med*; 1987, 317:265-271.
8. Blanco F, Kalsi J and Isenberg DA. Analysis of antibodies to RNA in patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic diseases. *Clin exp Immunol*; 1991, 86:66-70
9. Stetler DA and Cavallo T. Anti-RNA polymerase I antibodies: potential role in the induction and progression of murine lupus nephritis. *J Immunol*; 1987, 138:2119.
10. Teh LS, Lee MK, Wang F, Manivasagar M and Williams BD. Anti-ribosomal P protein antibodies in different populations of patients with SLE *Br J Rheumatol*; 1993, 32:663-665.
11. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control, National Institute for Health, HHS Pub. No (CDC) 93-8395) 1993.
12. Isshi K, and Hirohata S. Association of anti-ribosomal P protein antibodies with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum*; 1996, 39:1483-1490.
13. Fujimoto M., Sato S. and Tamaki K et al. Detection of anti-ribosomal P protein antibodies in patients with systemic sclerosis. *Br J Rheumatol*; 1995, 34:908-991.
14. Schneebaum AB, Singleton JD, Sterling G. et al. Association of psychiatric manifestations with antibodies to ribosomal P proteins in SLE. *Am J Med*; 1991, 90:54-62.

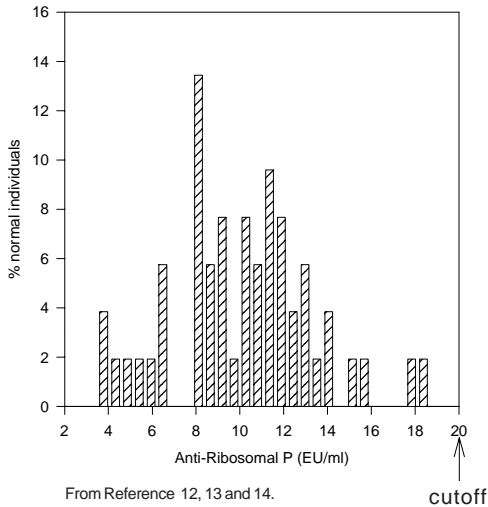
**Table 1: Incidence of anti-RNA Antibodies in Collagen-Vascular Disorders**

Disease Group	n	No. Positive	% Positive
SLE	138	13	9.4
Rheumatoid Arthritis	25	0	0
Sjögren's Syndrome	25	0	0
Scleroderma	25	0	0
Normals	80	1	1.2

**Table 2: Precision**

	inter-assay %CV	intra-assay %CV
<b>Sample 1</b>	3.8	6.3
<b>Sample 2</b>	3.5	3.6

**Figure 1: Distribution of Normal Population with Anti-Ribosomal P ImmuLisa™**



**Table 3: Recovery**

	RNA-Ab conc. added (EU/ml)	RNA-Ab conc. obtained (EU/ml)	% Recovery
<b>Sample 1</b>	135	147	109
<b>Sample 2</b>	113	117	104
<b>Sample 3</b>	56	61	108

*For technical assistance please contact:*



**IMMCO Diagnostics, Inc.**

**60 Pineview Drive**

**Buffalo, NY 14228-2120**

**Telephone: (716) 691-0091**

**Fax: (716) 691-0466**

**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

**Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST**

**E-Mail: [info@immcodiagnostics.com](mailto:info@immcodiagnostics.com)**

*or your local product distributor*



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante

Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)