

Anti-native DNA (nDNA) Antibody Test

Crithidia luciliae Substrate

IVD For in vitro Diagnostic Use

PRODUCT INSERT

REF 1106 48 Determination

REF 1106-2 96 Determination

REF 1106-6 120 Determination

INTENDED USE

An indirect immunofluorescence antibody test for the detection and quantitation of antibodies to native (double stranded) deoxyribonucleic acid (nDNA) in human serum.

SUMMARY AND EXPLANATION

Antibodies to nDNA are specific for systemic lupus erythematosus (SLE) and rarely occur in patients with rheumatoid arthritis, scleroderma or other autoimmune disorders¹. The frequency and titer of these antibodies fluctuate with disease activity and tend to disappear upon immunosuppressive treatment and during remission. There is a good correlation between the disease activity and anti-nDNA antibody levels²⁻⁸.

The two most commonly employed methods for detecting anti-nDNA antibodies are radioimmunoassay and immunofluorescence. The specificity and sensitivity of the *Crithidia luciliae* immunofluorescent method are comparable or even better than radioimmunoassay^{9,10}. The indirect immunofluorescent test using *Crithidia luciliae* as the antigenic substrate is a simple and specific method for detecting anti-nDNA antibodies.¹¹ *Crithidia luciliae* contains a kinetoplast, an organelle consisting of compact circular DNA which reacts bright apple-green when the test specimen is positive.¹²

PRINCIPLES OF PROCEDURE

In the indirect immunofluorescence method used in this kit, patients' sera are incubated on smears of *Crithidia luciliae* to allow binding of antibodies to the substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled, anti-human IgG conjugate. When observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters, positive reactions appear as apple green fluorescence of the kinetoplast with or without associated nuclear staining^{12,13}. The titer, which is the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction, is determined by testing serial dilutions¹³.

PRODUCT INFORMATION

Storage and preparation

Store all reagents at 2-8°C. Reagents are ready for use after equilibration to room temperature.





Materials provided

ImmuGlo™ nDNA Kit	REF 1106
ImmuGlo™ nDNA Kit	REF 1106-2
ImmuGlo™ nDNA Kit	REF 1106-6

Kits contain sufficient reagents to perform 48 determinations each.

8 x	SORB SLD 6	6 well Substrate Slides, <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106)
16 x	SORB SLD 6	6 well Substrate Slides, <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106-2)
20 x	SORB SLD 6	6 well Substrate Slides, <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106-6)
1 x 0.5 ml	CONTROL + nDNA	nDNA Positive Control. Contains human serum.
1 x 0.5 ml	CONTROL -	Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB	Anti-human IgG FITC Conjugate containing Evan's Blue. Protect from light. (2x REF 1106-2, 1106-6)
1 x 60 ml	BUF	Buffered Diluent.
2 vials	BUF WASH	Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM	Mounting Medium. Do not freeze. (2x REF 1106-2, 1106-6)
1 x 12	COVER SLD	Coverslips. (2x REF 1106-2, 1106-6)


EN
Optional Components

5 ml	 IgG-CONJ FITC	Anti-human IgG FITC conjugate. Protect from light.  2100X
1 ml	 EVANS	Evan's blue counterstain*.  2510.

Symbols used on labels:

 LOT Lot number

 REF Catalog number

 IVD In vitro diagnostic use


 Use by


 Storage temperature

 Consult instructions for use

 Number of tests

 Manufacturer

 Date of Manufacture

 * Danger. May cause cancer. Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection. Store locked up. Dispose of contents/container to comply with local, state and federal regulations.

Material required but not provided

- Fluorescence microscope
- Micropipette or Pasteur pipette
- Serological pipettes
- Staining dish (e.g. Coplin jar)
- Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack
- Distilled or deionized water
- 1 liter container
- Wash bottle
- Paper towels
- Incubation chamber

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. AH human derived components used have been tested for HbsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regard-less of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁴.

WARNING – Sodium azide (NaN₃) 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 insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Do not use beyond expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer Storage, serum should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Test Method

A. Screening

1. Dilute each patient serum 1:10 with the Buffered Diluent provided (10 µl serum + 90 µl Diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.

EN

2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for 10-15 minutes. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 μ l) of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of Positive Control to well #2. Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 50 μ l) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash 10 minutes. Repeat process with all remaining slides.
8. Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the Conjugate dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 μ l) to each well.
9. Repeat steps **7 and 8** for each slide.
10. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate 30 minutes at room temperature.
11. Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for 10 minutes. If optional conjugate without counterstain is used (see optional components in Materials Provided Section), 2-3 drops of Evan's Blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **3 drops** of Mounting Medium evenly on the coverslip and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.
14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.

Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed for up to 48 hours. Slides should be stored in the dark at 2-8°C.

B. Endpoint Determination (titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following steps 5 through 13 to determine the titer. Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make serial two-fold dilutions starting at 1:10. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

Preparation of Serial Dilutions

Number six tubes 1 through 6. Add 0.9 ml of Sample Diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 6. Pipette 0.1 ml of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 0.2 ml from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 0.2 ml from one tube to the next after mixing to yield the dilutions depicted in the following table:

Tubes	1	2	3	4	5	6
Serum	0.1 ml					
	+					
Buffered Diluent	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transfer	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	
Final dilution	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

QUALITY CONTROL

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run. The Negative Control should show no specific fluorescence of the kinetoplast. The Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of this structure. If expected results are not obtained, the run should be repeated, continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control
- Problems with the optical system of the fluorescence microscope, improper alignment, bulb beyond useful life expectancy, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.

INTERPRETATION OF RESULTS

The results of the tests for anti-*n*DNA antibodies should be reported as negative (<10), positive, (greater or equal to 320) or alternatively positive with specific endpoint titre.

EN

Read only fields which contain well separated *C. luciliae*. Observe for specific staining of the kinetoplast (see figure 1 at the end of this document). Staining of the nucleus or the polar body should not be interpreted as a positive DNA antibody test. Absence of specific staining of the kinetoplast is considered negative for antibodies to *n*DNA.

LIMITATION OF THE PROCEDURE

In some cases, sera positive for kinetoplast staining may either be very weak or negative at the initial screening dilution prozone phenomenon. In such doubtful cases the sera should be screened at higher dilutions and, if positive, antibody titers determined.

In rare instances false positive reactions may be observed. These may be due to the presence of high levels of lipoproteins or other proteins which bind to DNA^{12,13}.

The goat anti-human IgG FITC Conjugate supplied in this kit is primarily heavy chain specific but has some light chain activity. It reacts primarily with IgG class autoantibodies, but may, to a lesser degree, react with light chains of other classes such as IgM.

The clinician should consider the results of all positive indirect immunofluorescence tests along with the results of other laboratory tests and the clinical condition of the patient when making a diagnosis.

EXPECTED VALUES

As seen in Table 1 at the end of this document, anti-*n*DNA antibodies are not detected (titer <10) in sera from normal subjects or patients with scleroderma or rheumatoid arthritis. Anti-*n*DNA antibodies occur (titer >10) in over one half of patients with SLE.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The ImmuGlo™ *n*DNA Antibody test was compared with another commercially available fluorescent antibody test using *C. luciliae* as a substrate. The comparison included 106 serum samples from normal subjects as well as from patients with the diagnosis of SLE, scleroderma, or rheumatoid arthritis. Sera were tested according to the procedure and screening dilution recommended by the manufacturer. These yielded comparable results as summarized in Table 2.

Ανάλυση αντισωμάτων κατά του φυσικού DNA (nDNA)

Υπόστρωμα *Crithidia luciliae*

IVD Για in vitro διαγνωστική χρήση

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

- REF** 1106 Κιτ αντισωμάτων κατά του φυσικού DNA (nDNA) 48 Προσδιορισμοί
REF 1106-2 Κιτ αντισωμάτων κατά του φυσικού DNA (nDNA) 96 Προσδιορισμοί
REF 1106-6 Κιτ αντισωμάτων κατά του φυσικού DNA (nDNA) 120 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια ανάλυση αντισωμάτων έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων κατά του φυσικού (δίκλωνου) δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (nDNA) σε ορό ανθρώπου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα αντισώματα κατά του nDNA είναι ειδικά για το συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (ΣΕΛ) και εμφανίζονται σπάνια σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, σκληροδερμία ή άλλες αυτοάνοσες διαταραχές¹. Η συχνότητα και ο τίτλος αυτών των αντισωμάτων παρουσιάζουν διακυμάνσεις ανάλογα με τη δραστηριότητα της νόσου και τείνουν να εξαφανιστούν με τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικής θεραπείας, καθώς και κατά τη διάρκεια ύφεσης. Υπάρχει μεγάλη συσχέτιση ανάμεσα στη δραστηριότητα της νόσου και τα επίπεδα αντισωμάτων αντι-nDNA²⁻⁸.

Οι δύο πιο κοινά εφαρμοζόμενες μέθοδοι ανίχνευσης των αντισωμάτων αντι-nDNA είναι η ραδιοανοσολογική ανάλυση και ο ανοσοφθορισμός. Η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου ανοσοφθορισμού *Crithidia luciliae* είναι συγκρίσιμες ή ακόμη καλύτερες από τις αντίστοιχες της ραδιοανοσολογικής ανάλυσης^{9,10}. Η ανάλυση έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας την *Crithidia luciliae* ως αντιγονικό υπόστρωμα είναι μια απλή και ειδική μέθοδος ανίχνευσης αντισωμάτων αντι-nDNA.¹¹ Ο οργανισμός *Crithidia luciliae* περιέχει έναν κινητοπλάστη, ένα οργανίδιο που αποτελείται από συμπαγές κυκλικό DNA, το οποίο δίνει αντίδραση έντονου πράσινου χρώματος όταν το εξεταζόμενο δείγμα είναι θετικό.¹²

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Στη μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού που χρησιμοποιείται σε αυτό το κιτ, οι οροί των ασθενών επωάζονται σε επιχρίσματα *Crithidia luciliae*, προκειμένου να επιτευχθεί η δέσμευση του αντισώματος στο υπόστρωμα. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύονται αφαιρούνται με έκπλυση της αντικειμενοφόρου. Τα αντισώματα τάξης IgG που έχουν δεσμευθεί ανιχνεύονται μέσω της επώασης του υποστρώματος με συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης IgG, το οποίο είναι σημασμένο με φλουοροσκεΐνη. Κατά την παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού εξοπλισμένο με τα κατάλληλα φίλτρα, οι θετικές αντιδράσεις εμφανίζονται ως φθορισμός έντονου πράσινου χρώματος του κινητοπλάστη με ή χωρίς σχετική χρώση του πυρήνα^{12,13}. Ο τίτλος, ο οποίος είναι το αντίστροφο της μεγαλύτερης αραιώσης που δίνει θετική αντίδραση, προσδιορίζεται με την ανάλυση διαδοχικών αραιώσεων¹³.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΪΟΝ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια φυλάσσονται στους 2-8°C. Τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση, αφού φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Υλικά που παρέχονται

- Κιτ αντισωμάτων κατά του φυσικού DNA (nDNA) ImmuGlo™ **REF** 1106
 Κιτ αντισωμάτων κατά του φυσικού DNA (nDNA) ImmuGlo™ **REF** 1106-2
 Κιτ αντισωμάτων κατά του φυσικού DNA (nDNA) ImmuGlo™ **REF** 1106-6

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 48 προσδιορισμών.

8 x	[SORB SLD 6]	6 αντικειμενοφόροι υποστρώματος, <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106)
16 x	[SORB SLD 6]	6 αντικειμενοφόροι υποστρώματος, <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106-2)
20 x	[SORB SLD 6]	6 αντικειμενοφόροι υποστρώματος, <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106-6)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + nDNA]	Διάλυμα θετικού ελέγχου για nDNA. Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 0,5 ml	[CONTROL -]	Διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 5 ml	[IgG-CONJ FITC EB]	Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgG με χρωστική Evans Blue. Να προστατεύεται από το φως. (2x REF 1106-2, 1106-6)
1 x 60 ml	[BUF]	Αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα.







EL


2 φιαλίδια	BUF WASH	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Διαλύστε κάθε φιαλίδιο έως όγκο 1 λίτρου.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM	Μέσο επικάλυψης. Να μην καταψύχεται. (2x REF 1106-2, 1106-6)
1 x 12	COVER SLD	Καλυπτρίδες. (2x REF 1106-2, 1106-6)

Προαιρετικά συστατικά

5 ml	IgG-CONJ FITC	Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgG. Να προστατεύεται από το φως. REF 2100X.
1 ml	EVANS	Επίχρωση Evan's blue*. REF 2510.

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT	Αριθμός Παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
IVD	Διαγνωστική χρήση in vitro
	Χρήση έως
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Αριθμός δοκιμών
	Κατασκευαστής
	Ημερομηνία κατασκευής

 * Κίνδυνος. Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση. Μην το χρησιμοποιήσετε πριν διαβάσετε και κατανοήσετε τις οδηγίες προφύλαξης. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: Συμβουλευθείτε / Επισκεφθείτε γιατρό. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια / πρόσωπο. Φυλάσσεται κλειδωμένο. Φυλάσσεται κλειδωμένο. Διάθεση του περιεχομένου/περιέκτη στο εγκεκριμένο διάθεσης αποβλήτων.

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Μικροσκόπιο φθορισμού
- Μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur
- Ορολογικές πιπέτες
- Τρυβλίο χρώσης (π.χ. δοχείο Corlin)
- Μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες (π.χ. 13 x 75 mm) και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων.
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Περιέκτης ενός λίτρου
- Φιάλη έκπλυσης
- Απορροφητικά χαρτιά
- Θάλαμος επώασης

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HbsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Όλα τα δείγματα ανθρώπινου ορού και τα προϊόντα ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα, ανεξάρτητα από την προέλευση τους. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έκχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹⁴.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ - Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση αυτής της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασίες 2-8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, ο ορός θα πρέπει να καταψυχθεί στους -20°C. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**Μέθοδος ανάλυσης****A. Ανάλυση διαλογής**

1. Αραιώστε τον ορό κάθε ασθενούς σε αναλογία 1:10 με το αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται (10 μl ορού + 1,0 ml αραιωτικό διάλυμα). Μην αραιώνετε τα διαλύματα θετικού ή αρνητικού ελέγχου. Φυλάξτε τους μη αραιωμένους ορούς για να προσδιορίσετε τους τίτλους αντισωμάτων, εάν οι αναλύσεις διαλογής βρεθούν θετικές.
2. Αφήστε τις θήκες που περιέχουν τις αντικειμενοφόρους του υποστρώματος επί 10-15 λεπτά, προκειμένου να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρέστε προσεκτικά τις αντικειμενοφόρους χωρίς να αγγίξετε το υπόστρωμα.
3. Σημάνετε τις αντικειμενοφόρους και τοποθετήστε τις σε ένα θάλαμο επώασης που έχετε καλύψει με απορροφητικό χαρτί εμποτισμένο με νερό για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση.
4. Αναστρέψτε το σταγονόμετρο και πιέστετο ελαφρά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl) του διαλύματος αρνητικού ελέγχου στην κυψελίδα υπ' αριθμό 1. Με τον ίδιο τρόπο, προσθέστε 1 σταγόνα διαλύματος θετικού ελέγχου στην κυψελίδα υπ' αριθμό 2. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
5. Χρησιμοποιώντας μια μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur, προσθέστε 1 σταγόνα από τον αραιωμένο ορό του ασθενούς (περίπου 50 μl) στις υπόλοιπες κυψελίδες. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
6. Τοποθετήστε το καπάκι στο θάλαμο επώασης και επωάστε τις αντικειμενοφόρους επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εκπλύνετε με περίπου 10 ml PBS χρησιμοποιώντας μια πιπέτα ή εκπλύνετε την αντικειμενοφόρο σε κύπελλο που περιέχει PBS. Μην χρησιμοποιείτε φιάλη έκπλυσης. Μεταφέρετε την αντικειμενοφόρο αμέσως στο δοχείο Corlin και εκπλύνετε επί 10 λεπτά. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.
8. Αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους από το δοχείο Corlin. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο στο θάλαμο επώασης. Αναστρέψτε αμέσως το σταγονόμετρο του συζευκτικού αντισώματος και πιέστε μαλακά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl) σε κάθε κυψελίδα.
9. Επαναλάβετε τα βήματα **7 και 8** για κάθε αντικειμενοφόρο.
10. Τοποθετήστε εκ νέου το καπάκι στο θάλαμο επώασης. Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εμβαπίστε την σε ένα ποτήρι ζέσεως με PBS για να αφαιρέσετε την περίσσεια συζευκτικού αντισώματος. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε ένα τρυβλίο χρώσης που έχει πληρωθεί με PBS επί 10 λεπτά. Εάν χρησιμοποιηθεί προαιρετικό συζευκτικό αντισώμα χωρίς επίχρωση (δείτε τα προαιρετικά συστατικά στην ενότητα "Υλικά που παρέχονται"), μπορείτε να προσθέσετε 2-3 σταγόνες επίχρωσης Evans blue στην τελική έκπλυση. Επαναλάβετε για τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τυχόν ακατάλληλη έκπλυση ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένο φθορισμό υποβάθρου.
12. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το δίσκο χρώσης. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. **Για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση της αντικειμενοφόρου, προχωρήστε αμέσως στο επόμενο βήμα, ενόσω η αντικειμενοφόρος είναι ακόμη υγρή.**
13. Εφαρμόστε την καλυπτρίδα, προσθέτοντας **3 σταγόνες** μέσου επικάλυψης ομοιόμορφα επάνω στην καλυπτρίδα και τοποθετήστε την πάνω από την αντικειμενοφόρο. Αποφύγετε την εφαρμογή άσκοπης πίεσης και αποτρέψτε την πλευρική πίεση της καλυπτρίδας.
14. Επαναλάβετε τα βήματα **12 και 13** για κάθε αντικειμενοφόρο.
15. Εξετάστε για ειδικό φθορισμό με μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση 200x ή μεγαλύτερη.

Οι αντικειμενοφόροι μπορούν να διαβαστούν μόλις προετοιμαστούν. Ωστόσο, εξαιτίας της παρουσίας παράγοντα προστασίας φθορισμού στο μέσο καθήλωσης, δεν εμφανίζεται σημαντική απώλεια της έντασης της χρώσης, εάν η ανάγνωση καθυστερήσει έως και 48 ώρες. Οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να φυλάσσονται σε σκοτεινό χώρο, σε θερμοκρασία 2-8°C.

B. Προσδιορισμός τελικού σημείου (πιλοδότηση)

Ένα ορός που βρέθηκε θετικός στην ανάλυση διαλογής μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω ακολουθώντας τα βήματα 5 έως 13 για να προσδιοριστεί ο τίτλος του. Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τα διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου. Εκτελέστε διαδοχικές διπλές αραιώσεις ξεκινώντας από την αναλογία 1:10. Ο τίτλος είναι το αντίστροφο της μεγαλύτερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση.

Προετοιμασία των διαδοχικών αραιώσεων

Αριθμήστε έξι σωληνάρια από το 1 έως το 6. Προσθέστε 0,9 ml διαλύματος αραιώσης δειγμάτων στο σωληνάριο 1 και 0,2 ml στα σωληνάρια 2 έως 6. Μεταφέρετε με πιπέτα 0,1 ml μη αραιωμένου ορού στο σωληνάριο 1 και αναμίξτε επιμελώς. Μεταφέρετε 0,2

EL

ml από το σωληνάριο 1 στο σωληνάριο 2 και αναμίξετε επιμελώς. Συνεχίστε τη μεταφορά 0,2 ml από το ένα σωληνάριο στο επόμενο μετά από ανάμιξη, προκειμένου να επιτύχετε τις αραιώσεις που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Σωληνάριο	1	2	3	4	5	6
Ορός	0,1 ml					
	+					
Αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
	↻	↻	↻	↻	↻	
Μεταφορά	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Τελική αραιώση	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τόσο ένα διάλυμα θετικού όσο και ένα διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου δεν θα πρέπει να παρουσιάζει ειδικό φθορισμό του κινητοπλάστη. Το διάλυμα θετικού ελέγχου θα πρέπει να παρουσιάζει 2+ ή μεγαλύτερη ένταση χρώσης της δομής αυτής.

Εάν δεν λάβετε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, θα πρέπει να επαναλάβετε την ανάλυση. Εάν συνεχίζουν να εμφανίζονται ανεπαρκή αποτελέσματα με τα διαλύματα ελέγχου, αυτά ενδέχεται να οφείλονται σε:

- Θολερότητα. Απορρίψτε το διάλυμα ελέγχου και χρησιμοποιήστε ένα άλλο
- Προβλήματα με το οπτικό σύστημα του μικροσκοπίου φθορισμού. Σε αυτά ενδέχεται να συμπεριλαμβάνονται: ακατάλληλη ευθυγράμμιση, παρέλευση της ωφέλιμης διάρκειας ζωής της λυχνίας, κλπ.
- Αποξήρανση της αντικειμενοφόρου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων για αντισώματα αντι-*nDNA* θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά (<10), θετικά (μεγαλύτερα ή ίσα με 320) ή εναλλακτικά, θετικά με τίτλο.

Παρατηρήστε μόνο πεδία που περιέχουν καλά διαχωρισμένους οργανισμούς *C. luciliae*. Αναζητήστε ειδική χρώση του κινητοπλάστη (βλ. εικόνα 1 στο τέλος αυτού του εντύπου). Τυχόν χρώση του πυρήνα ή του πολικού σωματίου δεν θα πρέπει να ερμηνευτεί ως θετικό αποτέλεσμα ανάλυσης DNA αντισωμάτων. Η απουσία ειδικής χρώσης του κινητοπλάστη θεωρείται αρνητικό αποτέλεσμα για αντισώματα κατά του *nDNA*.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οροί θετικοί για χρώση του κινητοπλάστη ενδέχεται να εμφανιστούν πολύ ασθενείς ή αρνητικοί στην αρχική αραιώση διαλογής (φαινόμενο προζώνης). Σε τέτοιες αμφίβολες περιπτώσεις, οι οροί θα πρέπει να εξετάζονται σε υψηλότερες αραιώσεις, και εάν βρεθούν θετικοί, να προσδιορίζονται οι τίτλοι των αντισωμάτων.

Σε σπάνιες περιπτώσεις ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικές αντιδράσεις. Αυτές ενδέχεται να οφείλονται στην παρουσία υψηλών επιπέδων λιποπρωτεϊνών ή άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες δεσμεύονται στο DNA¹²⁻¹³.

Το συζευκτικό αντίσωμα FITC αιγός κατά της ανθρώπινης IgG που παρέχεται σε αυτό το kit είναι κατά κύριο λόγο ειδικό για τις βαριές αλυσίδες, αλλά εμφανίζει κάποια δραστηριότητα και κατά των ελαφριών αλυσίδων. Αντιδρά κυρίως με τα αυτοαντισώματα τάξης IgG, αλλά ενδέχεται να αλληλεπιδρά, σε μικρότερο βαθμό, με τις ελαφριές αλυσίδες άλλων τάξεων, όπως της IgG.

Ο κλινικός ιατρός θα πρέπει να εξετάσει τα αποτελέσματα όλων των θετικών αναλύσεων έμμεσου ανοσοφθορισμού σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών εξετάσεων και την κλινική κατάσταση του ασθενούς, προκειμένου να καταλήξει σε διάγνωση.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1 στο τέλος αυτού του εντύπου, δεν ανιχνεύονται αντισώματα αντι-*nDNA* (τίτλος <10) σε ορούς φυσιολογικών ατόμων ή ασθενών με σκληροδερμία ή ρευματοειδή αρθρίτιδα. Αντισώματα αντι-*nDNA* εμφανίζονται (τίτλος >10) σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς με ΣΕΛ.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η ανάλυση αντισωμάτων κατά του *nDNA* ImmuGlo™ συγκρίθηκε με μια άλλη διαθέσιμη στο εμπόριο ανάλυση αντισωμάτων φθορισμού χρησιμοποιώντας τον οργανισμό *C. luciliae* ως υπόστρωμα. Η σύγκριση συμπεριέλαβε 106 δείγματα ορού από φυσιολογικά άτομα, καθώς και ορούς από ασθενείς με διαγνωσμένο ΣΕΛ, σκληροδερμία ή ρευματοειδή αρθρίτιδα. Οι οροί αναλύθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία και την αραιώση ελέγχου που προτείνεται από τον παρασκευαστή. Αυτοί έδωσαν συγκρίσιμα αποτελέσματα, τα οποία συνοψίζονται στον πίνακα 2.

Detección de anticuerpos anti- ADN nativo (nADN)

Substrato *Crithidia luciliae*

IVD Para uso diagnóstico in vitro

PRODUCT INSERT

REF 1106 48 Determination

REF 1106-2 96 Determination

REF 1106-6 120 Determination

USO PREVISTO

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta para la detección y cuantificación de anticuerpos anti-ácido desoxirribonucleico nativo (de doble cadena) (nADN).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos anti-nADN son específicos del lupus eritematoso sistémico (LES) y raramente se presentan en pacientes con artritis reumatoide, esclerodermia u otras patologías autoinmunes¹. La frecuencia y título de estos anticuerpos varía con la actividad de la dolencia y tienden a desaparecer bajo tratamiento inmunosupresor y durante la remisión. Existe una buena relación entre la actividad de la dolencia y los niveles de anticuerpos anti- nADN²⁻⁸.

Los dos métodos usados con más frecuencia para la detección de anticuerpos anti-nADN son el radioinmunoensayo y la inmunofluorescencia. La especificidad y sensibilidad del método inmunofluorescente con substrato *Crithidia luciliae* son iguales e aún mejores que las del radioinmunoensayo^{9,10}. El ensayo de inmunofluorescencia indirecta que utiliza *Crithidia luciliae* como substrato antigénico es un método simple y específico para la detección de anticuerpos anti-nADN.¹¹ *Crithidia luciliae* contiene un cinetoplasto, un organelo que consiste en una masa compacta de ADN circular que reacciona con color verde manzana brillante si la muestra analizada es positiva.¹²

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

En el método de inmunofluorescencia indirecta usado en este ensayo, el suero de los pacientes se incuba en frotis de *Crithidia luciliae* para permitir que los anticuerpos se unan al substrato. Los anticuerpos no unidos se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos de clase IgG se detectan incubando el substrato con conjugado de IgG antihumano marcado con fluoresceína. Las reacciones se observan en microscopio de fluorescencia con filtros adecuados; las reacciones positivas son reveladas por una fluorescencia del cinetoplasto de color verde manzana, con o sin coloración nuclear asociada^{12,13}. El título (el recíproco de la mayor dilución que provocó una reacción positiva) se determina analizando las diluciones seriadas¹³.

DATOS DEL PRODUCTO

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. Los reactivos están listos para su uso tan pronto como alcanzan la temperatura ambiente.

Materiales suministrados

Kit nDNA ImmuGlo™ **REF** 1106

Kit nDNA ImmuGlo™ **REF** 1106-2

Kit nDNA ImmuGlo™ **REF** 1106-6

Los reactivos son suficientes para efectuar 48 análisis cada uno.

8 x	SORB SLD 6	Portas substrato <i>Crithidia luciliae</i> , 6 pocillos (REF 1106)
16 x	SORB SLD 6	Portas substrato <i>Crithidia luciliae</i> , 6 pocillos (REF 1106-2)
20 x	SORB SLD 6	Portas substrato <i>Crithidia luciliae</i> , 6 pocillos (REF 1106-6)
1 x 0,5 ml	CONTROL+ nDNA	Control positivo a nADN. Contiene suero humano.
1 x 0,5 ml	CONTROL-	Control negativo. Contiene suero humano.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB	Conjugado de IgG antihumano con FITC. Contiene azul de Evans. Protéjase de la luz. (2x REF 1106-2, 1106-6)
1 x 60 ml	BUF	Diluyente tamponado.
2 viaes	BUF WASH	Tampón fosfato salino (PBS). Disolver cada vial hasta 1 litro.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM	Medio de montaje. No congelar. (2x REF 1106-2, 1106-6)

Componentes opcionales

5 ml [IgG-CONJ|FITC] Conjugado de IgG antihumana FITC. Protégase de la luz. [REF] 2100X.

1 ml [EVANS] Contratación azul de Evan*. [REF] 2510.

Símbolos empleados en las etiquetas:

Número de lote



Número de catálogo



Utilización diagnóstica in vitro



Utilizar antes de



Temperatura de almacenamiento



Consulte las instrucciones de uso



Número de análisis



Fabricante



Fecha de fabricación



*Peligro. Puede provocar cáncer. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Pedir instrucciones especiales antes del uso. No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Guardar bajo llave. Eliminar el contenido/el recipiente de residuos.

Material necesario no incluido

- Microscopio de fluorescencia
- Micropipetas o pipetas Pasteur
- Pipetas serológicas
- Cubeta de tinción (p.ej. cubeta de Coplin)
- Tubos de ensayo pequeños (p.e. 13 x 75 mm) y gradilla para tubos
- Agua destilada o desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco lavador
- Toallas de papel
- Cámara de incubación

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo material de origen humano usado en la preparación de este producto se ha examinado con métodos aprobados por la FDA, y resultó negativo a anticuerpos contra HIV, HbsAg y HCV. Las muestras de suero humano y los productos de origen humana deben considerarse potencialmente peligrosos independientemente de su origen. Respétense las buenas prácticas de laboratorio al conservar, dispensar y eliminar tales materiales¹⁴.

ATENCIÓN: la azida de sodio (NaN₃) puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías y formar azidas metálicas altamente explosivas. Después de dispensar líquidos, se recomienda lavar con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas. La azida de sodio puede ser tóxica por ingestión; en caso de ingestión accidental, informe inmediatamente del hecho al director del laboratorio o a un centro de control de envenenamientos.

Siga estrictamente las instrucciones tal como se presentan en este prospecto para garantizar resultados válidos. No cambie los componentes del kit con otros de otras fuentes o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. No los utilice después de la fecha de caducidad.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Este procedimiento requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas con microbios. Conserve las muestras a 2-8°C por no más de una semana. Para una conservación más prolongada, congele el suero a -20°C. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

ES PROCEDIMIENTO

Metodología del análisis

A. Control

1. Diluya el suero del paciente en proporción 1:10 con el diluyente tamponado (10 µl de suero + 90 µl de diluyente). No diluya los controles positivo o negativo. Conserve el suero no diluido para determinar la titulación de anticuerpos si los análisis resultaran positivos.
2. Espere a que las bolsas con los portas de substrato se estabilicen a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraiga los portas cuidadosamente sin tocar el substrato.
3. Etiquete los portas y colóquelos en la cámara de incubación acondicionada con toallas de papel humedecidas para mantener las condiciones de humedad adecuadas.
4. Invierta el frasco gotero y aplique suavemente 1 gota (aproximadamente 50 µl) de control negativo en el pocilio #1. Del mismo modo, aplique 1 gota de control positivo en el pocilio #2. No llene demasiado los pocillos.
5. Con una micropipeta o pipeta Pasteur, coloque 1 gota de suero diluido del paciente (aproximadamente 50 µl) en los restantes pocillos. No llene demasiado los pocillos.
6. Coloque la tapa de la cámara de incubación; incube los portas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Retire un porta de la cámara de incubación. Sosteniéndolo por un extremo, lávelo delicadamente con una pipeta y aproximadamente 10 µl de PBS, o bien en un recipiente lleno de PBS. No utilice frasco de lavado. Transfiera de inmediato el porta a una cubeta de Coplin y lávelo durante 10 minutos. Repita el procedimiento con los restantes portas.
8. Retire los portas de la cubeta de Coplin. Seque el borde de los portas con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Ponga los portas en la cámara de incubación. Acto seguido, con el frasco gotero de conjugado aplique 1 gota (aproximadamente 50 µl) a cada pocilio.
9. Repita los pasos **7 y 8** para cada porta.
10. Coloque la tapa en la cámara de incubación. Incube 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraiga un porta del incubador. Sosteniéndolo por un extremo, sumérgalo en un recipiente con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Ponga los portas en una cubeta de coloración llena de PBS durante 10 minutos. Si está usando el conjugado opcional sin contraste (véanse los componentes opcionales en el apartado "Material suministrado"), puede añadir 2-3 gotas de azul de Evans en el lavado final. NOTA: un lavado inadecuado podría aumentar la fluorescencia de fondo.
12. Retire un porta de la cubeta de coloración. Seque el borde con una toalla para eliminar el exceso de PBS. **Para evitar que el porta se seque, pase de inmediato a la fase sucesiva mientras el porta todavía está húmedo.**
13. Monte el cubre aplicando uniformemente **3 gotas** de medio de montaje en la superficie; ponga el cubre sobre el porta sin presionar demasiado y evitando que el cubre se desplace lateralmente.
14. Repita los pasos 12 y 13 para cada porta.
15. Examine la fluorescencia específica con microscopio de fluorescencia con aumento de 200x o más.

Los portas se han de leer tan pronto como estén listos. Sin embargo, gracias a la presencia de un agente antedecoloración en el medio de montaje, no se produce una disminución significativa en la intensidad de coloración aunque la lectura se postergue por 48 horas. Los portas deben conservarse en la oscuridad a una temperatura entre 2 y 8°C.

B. Determinación de punto final (titulación)

Un suero que resulte positivo en la fase de control puede ser analizado nuevamente siguiendo los pasos de 5 a 13 para determinar el título. Cada ciclo de análisis incluirá los controles positivo y negativo. Prepare diluciones en serie y por duplicado a partir de 1:10. El recíproco de la mayor dilución que provoca una reacción positiva es la titulación.

Preparación de diluciones en serie

Numere seis tubos de 1 a 6. Ponga 0,9 ml de diluyente de muestras en el tubo 1, y 0,2 ml en los tubos de 2 a 6. Pipetee 0,1 ml de suero sin diluir en el tubo 1 y mezcle bien. Transfiera 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezcle bien. Siga transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente después de mezclar bien hasta producir las diluciones indicadas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4	5	6
Suero	0,1 ml					
	+					
Diluyente tamponado	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transferir	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Dilución final	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

ES

CONTROL DE CALIDAD

En cada ciclo de análisis se deben incluir un control positivo y un control negativo. El control negativo no debe evidenciar una fluorescencia específica del cinetoplasto, mientras que el control positivo debe tener intensidad de coloración 2+ o superior para esta estructura. Si no se obtienen los resultados esperados, hay que repetir el análisis.

Si se siguen obteniendo resultados inadecuados con los controles, puede deberse a:

- Turbidez. Descarte el control y utilice otro.
- Problemas en el sistema óptico del microscopio de fluorescencia tales como alineación incorrecta, lámpara que debe ser cambiada, etc.
- El porta se secó durante el proceso.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de los análisis de detección de anticuerpos anti-*n*ADN se han de considerar negativos (<10), positivos (igual o superior a 320) o en alternativa, positivos con título de punto final específico.

Lea solamente los campos que contienen *C. luciliae* bien separado. Observe la coloración específica del cinetoplasto (véase la figura 1 al final de este documento). La tinción del núcleo o del cuerpo polar no debe interpretarse como un resultado positivo a anticuerpos anti-ADN. La ausencia de coloración específica del cinetoplasto se interpreta como resultado negativo a anticuerpos anti-*n*ADN.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunos casos, un suero positivo a la tinción del cinetoplasto puede resultar muy débil o negativo en el control inicial de dilución (fenómeno prozona). En estos casos dudosos, el suero debe ser sometido a control en diluciones más altas; si resultara positivo, se determinarán los títulos del anticuerpo.

En raras ocasiones pueden observarse reacciones falsamente positivas, originadas por la presencia de niveles altos de lipoproteínas u otras proteínas que se unen al ADN^{12,13}.

El conjugado de IgG antihumana de cabra con FITC incluido en este kit es principalmente específico de la cadena pesada, aunque tiene una ligera actividad de cadena ligera. Reacciona fundamentalmente con autoanticuerpos de clase IgG, pero en menor grado puede reaccionar con cadenas ligeras de otras clases, tales como IgM.

Al formular su diagnóstico, el médico evaluará los resultados de todos los análisis positivos de inmunofluorescencia indirecta junto con los resultados de otros análisis de laboratorio y las condiciones clínicas del paciente.

VALORES ESPERADOS

Como se muestra en la tabla 1 al final de este documento, los anticuerpos anti-*n*ADN no se detectan (título <10) en el suero de individuos normales o de pacientes con esclerodermia o artritis reumatoide; en cambio, esos anticuerpos están presentes (título >10) en más de la mitad de los pacientes con LES.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El ensayo ImmuGlo™ anticuerpos anti-*n*ADN se comparó con otro análisis de fluorescencia disponible en comercio, que también utiliza como substrato *C. luciliae*. Para la comparación se utilizaron 106 muestras de suero, tanto de individuos normales como de pacientes a los que se diagnosticó LES, esclerodermia o artritis reumatoide. Las muestras se analizaron siguiendo el procedimiento y las diluciones de control indicados por el fabricante. Los resultados obtenidos se comparan en la tabla 2.

Anti-native-DNA-Antikörpertest (nDNA)

Crithidia-luciliae-Substrat

IVD Für in -vitro-Diagnostik

PRODUCT INSERT

REF 1106 48 Determination

REF 1106-2 96 Determination

REF 1106-6 120 Determination

VERWENDUNGSZWECK

Ein indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von Antikörpern gegen native (doppelsträngige) Desoxyribonukleinsäure (nDNA) in Humanserum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Antikörper gegen nDNA sind spezifisch für systemischen Lupus erythematodes (SLE) und treten nur selten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, Sklerodermie oder anderen Autoimmunerkrankheiten auf¹. Die Häufigkeit und der Titer dieser Antikörper schwanken mit der Krankheitsaktivität und neigen dazu, während der Behandlung mit Immunsuppressiva und während der Remission vollständig zurückzugehen. Es besteht eine gute Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und dem Spiegel der Anti-nDNA-Antikörper²⁻⁸.

Die beiden am häufigsten verwendeten Methoden für den Nachweis von Anti-nDNA-Antikörpern sind Radioimmuntests und Immunfluoreszenz. Die Spezifität und Sensitivität der *Crithidia luciliae*-Immunfluoreszenzmethode sind vergleichbar mit oder sogar besser als die des Radioimmuntests⁹⁻¹⁰. Der indirekte Immunfluoreszenztest mit *Crithidia luciliae* als Antigensubstrat ist eine einfache und spezifische Methode für den Nachweis von Anti-nDNA-Antikörpern.¹¹ *Crithidia luciliae* enthält einen Kinetoplasten, ein Organell aus kompakter runder DNA, der bei einer positiven Probe leuchtend apfelgrün reagiert.¹²

TESTPRINZIPIEN

Bei der in diesem Kit verwendeten indirekten Immunfluoreszenzmethode werden Patientenserum auf *Crithidia luciliae*-Abstrichen inkubiert, um die Bindung der Antikörper an das Substrat zu ermöglichen. Nicht gebundene Antikörper werden durch Spülen entfernt. Gebundene Antikörper der Klasse IgG werden durch Inkubieren des Substrats mit Fluorescein-markiertem Anti-human-IgG-Konjugat nachgewiesen. Bei Betrachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Filtern erscheinen positive Reaktionen als apfelgrüne Fluoreszenzen des Kinetoplasten mit oder ohne assoziierte Kernfärbung^{12,13}. Der Titer ist der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die zu einer positiven Reaktion führt, und wird durch das Testen von Verdünnungsreihen bestimmt¹³.

PRODUKTINFORMATION

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, nachdem sie Raumtemperatur erreicht haben.

Mitgelieferte Materialien

ImmuGlo™ nDNA-Kit	REF	1106
ImmuGlo™ nDNA-Kit	REF	1106-2
ImmuGlo™ nDNA-Kit	REF	1106-6

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 48 Bestimmungen.

8 x	SORB SLD 6	Substrat-Objektträger mit 6 Vertiefungen, <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106)
16 x	SORB SLD 6	Substrat-Objektträger mit 6 Vertiefungen, <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106-2)
20 x	SORB SLD 6	Substrat-Objektträger mit 6 Vertiefungen, <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106-6)
1 x 0,5 ml	CONTROL + nDNA	nDNA-positives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
1 x 0,5 ml	CONTROL -	Negatives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB	Anti-human-IgG-FITC-Konjugat mit Evans-Blau. Vor Licht schützen. (2x REF 1106-2, 1106-6)
1 x 60 ml	BUF	Gepuffertes Verdünnungsmittel.
2 Fläschchen	BUF WASH	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). Jedes Fläschchen auf 1 Liter

DE

auffüllen.

1 x 5,0 ml

MOUNTING MEDIUM

Eindeckmittel. Nicht einfrieren. (2x **REF** 1106-2, 1106-6)

1 x 12

COVERSLID

Deckgläschen. (2x **REF** 1106-2, 1106-6)

Optionale Komponenten

5 ml

IgG-CONJ FITC

Anti-human IgG FITC Konjugat. Vor Licht schützen. **REF** 2100X.

1 ml

EVANS

Evans-Blau-Gegenfärbung*. **REF** 2510.

Auf den Etiketten verwendete Symbole:



Chargennummer



Katalognummer



In vitro diagnostischer Gebrauch



Verwenden bis



Lagertemperatur



Finden Sie Anweisungen für die Verwendung



Anzahl an Tests



Hersteller



Herstellungsdatum



*Gefahr. Kann Krebs erzeugen. Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Vor Gebrauch alle

Sicherheitshinweise lesen und verstehen. Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe

hinzuziehen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Unter Verschluss aufbewahren.

Unter Verschluss aufbewahren. Inhalt/Behälter im genehmigten Abfallbeseitigung entsorgen GH-Einstufung.

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Fluoreszenzmikroskop
- Mikropipette oder Pasteurpipette
- Serologische Pipetten
- Färbekasten (z.B. Coplin-Färbetrog)
- Kleine Teströhrchen (z.B. 13 x 75 mm) und Teströhrchenhalter
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- 1-Liter-Behälter
- Waschflasche
- Papiertücher
- Inkubationskammer

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Alle menschlichen Serumproben und Produkte menschlichen Ursprungs sollten unabhängig von ihrer Herkunft als potentiell gefährlich behandelt werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹⁴.

WARNUNG - Natriumazid (NaN₃) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer. Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben bei -20 °C eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

DE VERFAHREN

Testmethode

A. Suchtest

1. Verdünnen Sie jedes Patientenserum 1:10 mit dem mitgelieferten gepufferten Verdüner (10 µl Serum + 90 µl Verdüner). Verdünnen Sie nicht die positiven und negativen Kontrollseren. Bewahren Sie die unverdünnten Seren auf, um die Antikörpertiter zu bestimmen, falls Suchtests positiv ausfallen.
2. Lassen Sie die Beutel mit den Substratobjektträgern 10-15 Minuten lang bei Raumtemperatur liegen. Entfernen Sie vorsichtig die Objektträger, ohne das Substrat zu berühren.
3. Kennzeichnen Sie die Objektträger und legen Sie sie in eine Inkubationskammer, die mit mit Wasser befeuchteten Papiertüchern ausgelegt ist, um das Austrocknen zu verhindern.
4. Drehen Sie das Tropffläschchen um und drücken Sie es vorsichtig, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) negatives Kontrollserum in Vertiefung 1 zu geben. Geben Sie auf gleiche Art 1 Tropfen positives Kontrollserum in Vertiefung 2. Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.
5. Verwenden Sie einen Mikropipette oder Pasteurpipette, um jeweils 1 Tropfen (etwa 50 µl) des verdünnten Patientensersums in die übrigen Vertiefungen zu geben. Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.
6. Verschließen Sie die Inkubationskammer und inkubieren Sie die Objektträger 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
7. Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und spülen Sie ihn vorsichtig mit einer Pipette mit etwa 10 ml PBS ab, oder spülen Sie den Objektträger in einem mit PBS gefüllten Becher. Verwenden Sie keine Waschflaschen. Geben Sie den Objektträger sofort in einen Coplin-Trog und waschen Sie ihn 10 Minuten lang. Wiederholen Sie diesen Vorgang mit allen anderen Objektträgern.
8. Entfernen Sie den/die Objektträger aus dem Coplin-Trog. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. Legen Sie den Objektträger in die Inkubationskammer. Drehen Sie sofort das Tropffläschchen mit dem Konjugat um und drücken Sie es vorsichtig, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) in jede Vertiefung zu geben.
9. Wiederholen Sie Schritte **7 und 8** für jeden Objektträger.
10. Verschließen Sie die Inkubationskammer wieder. Inkubieren Sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
11. Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und tauchen Sie ihn in einen Becher mit PBS, um das überschüssige Konjugat zu entfernen. Belassen Sie den/die Objektträger 10 Minuten lang in einem mit PBS gefüllten Färbekasten. Falls das optionale Konjugat ohne Gegenfärbung verwendet wird (siehe "Optionale Bestandteile" im Abschnitt "Mitgelieferte Materialien"), können Sie der letzten Spülung 2-3 Tropfen Evans-Blau-Gegenfärbung hinzufügen. Wiederholen Sie den Vorgang mit den übrigen Objektträgern. ANMERKUNG: Unsachgemäßes Waschen kann zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führen.
12. Entfernen Sie einen Objektträger aus dem Färbekasten. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. **Fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt fort, während der Objektträger noch nass ist, um dessen Austrocknen zu verhindern.**
13. Bringen Sie das Deckgläschen an, indem Sie **3 Tropfen** Eindeckmittel gleichmäßig auf das Deckgläschen auftragen und dieses auf den Objektträger legen. Üben Sie keinen übermäßigen Druck aus und verhindern Sie eine seitliche Bewegung des Deckgläschens.
14. Wiederholen Sie Schritte 12 und 13 für jeden Objektträger.
15. Untersuchen Sie die Objektträger auf eine spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200-facher Vergrößerung.

Die Objektträger können sofort nach ihrer Vorbereitung abgelesen werden. Da das Eindeckmittel jedoch ein Mittel gegen das Verbleichen enthält, tritt kein signifikanter Verlust der Farbintensität ein, wenn das Ablesen um bis zu 48 Stunden verzögert wird. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8 °C gelagert werden.

B. Endpunkt-Bestimmung (Titration)

Sie können ein im Suchtest positives Serum weiter testen, indem Sie Schritte 5 bis 13 befolgen, um den Titer zu bestimmen. Bei jedem Testlauf sollten die positiven und negativen Kontrollseren mitverwendet werden. Stellen Sie beginnend mit 1:10 eine verdoppelnde Verdünnungsreihe her. Der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion hervorruft, entspricht dem Titer.

Vorbereitung der Verdünnungsreihen

Nummerieren Sie sechs Röhrrchen von 1 bis 6. Geben Sie 0,9 ml Probenverdüner in Röhrrchen 1 und je 0,2 ml in Röhrrchen 2 bis 6. Pipettieren Sie 0,1 ml unverdünntes Serum in Röhrrchen 1 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie 0,2 ml von Röhrrchen 1 in Röhrrchen 2 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie nach dem Mischen weiterhin jeweils 0,2 ml von einem Röhrrchen ins nächste, um die in der nachfolgenden Tabelle angezeigten Verdünnungen zu erhalten:

Röhrrchen	1	2	3	4	5	6
Serum	0,1 ml					
	+					
Gepuffertes	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Verdünner

	↻	↻	↻	↻	↻
Übertragung	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Endverdünnung	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160 1:320 etc.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl das positive als auch das negative Kontrollserum mitverwendet werden. Das negative Kontrollserum sollte keine spezifische Fluoreszenz des Kinetoplasten zeigen. Das positive Kontrollserum sollte eine Farbintensität des Kinetoplasten von 2+ oder höher aufweisen. Falls die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten werden, sollte der Testlauf wiederholt werden. Falls mit den Kontrollseren weiterhin unzureichende Ergebnisse erzielt werden, kann dies folgende Ursachen haben:

- Trübung. Verwerfen Sie das Kontrollserum und verwenden Sie ein neues.
- Probleme mit dem optischen System des Fluoreszenzmikroskops. Dazu können zählen: falsche Ausrichtung, die Lampe hat ihre Nutzungsdauer überschritten, usw.
- Der Objektträger ist während des Verfahrens ausgetrocknet.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Tests auf Anti-*n*DNA-Antikörper sollten als negativ (<10), positiv (größer oder gleich 320) oder alternativ als positiv mit Titer angegeben werden.

Lesen Sie nur Felder ab, die gut voneinander getrennte *C. luciliae* aufweisen. Achten Sie auf eine spezifische Färbung des Kinetoplasten (siehe Abb. 1 am Ende dieses Dokuments). Eine Färbung des Kerns oder des Polkörpers sollte nicht als positiver DNA-Antikörpertest interpretiert werden. Das Nichtvorhandensein einer spezifischen Färbung des Kinetoplasten wird als negativ für Antikörper gegen *n*DNA angesehen.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

In einigen Fällen können Seren mit positiver Kinetoplastfärbung aufgrund des Prozonophänomens bei der ersten Suchtestverdünnung entweder sehr schwach oder negativ sein. In solchen Zweifelsfällen sollten die Seren mit einer höheren Verdünnung getestet werden, und im Fall eines positiven Ergebnisses sollte der Antikörpertiter bestimmt werden.

In seltenen Fällen können falsche positive Reaktionen beobachtet werden. Dies kann auf hohe Konzentrationen von Lipoproteinen oder anderen Proteinen, die sich an DNA binden, zurückzuführen sein¹²⁻¹³.

Das in diesem Kit enthaltene Anti-human-IgG-FITC-Konjugat aus der Ziege ist hauptsächlich schwerkettenspezifisch, weist aber auch etwas Leichtkettenaktivität auf. Es reagiert überwiegend mit Autoantikörpern der Klasse IgG, kann jedoch in geringerem Umfang mit den Leichtketten anderer Klassen, z.B. IgM, reagieren.

Der Arzt sollte bei der Diagnose die Ergebnisse aller positiven indirekten Immunfluoreszenztests zusammen mit den Ergebnissen anderer Labortests und dem klinischen Zustand des Patienten erwägen.

ERWARTETE WERTE

Wie in Tabelle 1 am Ende dieses Dokuments zu sehen, werden Anti-*n*DNA-Antikörper im Serum von normalen Testpersonen oder von Patienten mit Sklerodermie oder rheumatoider Arthritis nicht nachgewiesen (Titer <10). Anti-*n*DNA-Antikörper treten bei mehr als der Hälfte der Patienten mit SLE auf (Titer >10).

LEISTUNGSMERKMALE

Der ImmuGlo™ *n*DNA-Antikörpertest wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Fluoreszenzantikörpertest mit *C. luciliae* als Substrat verglichen. Der Vergleich schloss 106 Serumproben von normalen Testpersonen sowie von Patienten mit einer Diagnose von SLE, Sklerodermie oder rheumatoider Arthritis ein. Die Seren wurden entsprechend den vom Hersteller empfohlenen Verfahren und Suchtestverdünnungen untersucht. Sie erbrachten vergleichbare Ergebnisse, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind.

Test anticorps anti-ADN natif (ADNn)

Substrat *Crithidia luciliae*

IVD Pour diagnostic in vitro

ENCART DU PRODUIT

REF 1106 48 Tests

REF 1106-2 96 Tests

REF 1106-6 120 Tests

USAGE PRÉVU

Test d'immunofluorescence indirecte pour la recherche et la quantification d'anticorps de l'acide désoxyribonucléique natif (double brin) (ADNn) dans le sérum humain.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les anticorps anti-ADNn sont spécifiques du lupus systémique érythémateux (SLE) et se manifestent rarement chez les malades atteints de polyarthrite rhumatoïde, de sclérodémie ou d'autres affections auto-immunes. La fréquence et le titre de ces anticorps fluctuent avec l'activité de la maladie et ont tendance à disparaître sous un traitement immunosuppresseur et pendant la période de rémission. Il existe une bonne corrélation entre l'activité de la maladie et le niveaux des anticorps anti-ADNn²⁻⁸.

Les deux méthodes les plus communément employées pour détecter les anticorps anti-ADNn sont le dosage radioimmunologique et l'immunofluorescence. La spécificité et la sensibilité de la méthode immunofluorescente *Crithidia luciliae* sont comparables ou même meilleures que le dosage radioimmunologique^{9,10}. Le test d'immunofluorescence indirecte en utilisant *Crithidia luciliae* en tant que substrat antigénique représente une méthode simple et spécifique de détection des anticorps anti-ADNn.¹¹ La *Crithidia luciliae* contient un kinétoplaste, une organelle qui est formé d'un ADN circulaire compact qui devient de couleur vert pomme brillant quand l'échantillon de test est positif.¹²

PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Dans la méthode par immunofluorescence indirecte utilisée dans cet équipement, le sérum du patient est incubé sur des taches de *Crithidia luciliae* pour permettre la liaison des anticorps avec le substrat. Tous les anticorps non liés sont éliminés par un rinçage. Les anticorps liés de la classe IgG sont détectés par incubation du substrat avec un conjugué d'anticorps à marquage fluoresceïne pour l'IgG humain. Quand elles sont observées sous un microscope à fluorescence équipé avec les filtres appropriés, les réactions positives apparaissent comme une fluorescence vert pomme du kinétoplaste avec ou sans coloration nucléaire^{12,13}. Le titre, qui est la réciproque du nombre représentant la plus forte dilution pour laquelle une réaction positive est observée, est déterminé en testant des dilutions en série¹³.

INFORMATION SUR LE PRODUIT

Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8 ° C. Les réactifs sont prêts à l'usage après un équilibrage à température ambiante.

Matériel fourni

ImmuGlo™ nDNA Kit **REF** 1106

ImmuGlo™ nDNA Kit **REF** 1106-2

ImmuGlo™ nDNA Kit **REF** 1106-6

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 48 tests chacun

8 x	SORB SLD 6	6 lames de substrat en puits, <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106)
16 x	SORB SLD 6	6 lames de substrat en puits, <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106-2)
20 x	SORB SLD 6	6 lames de substrat en puits, <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106-6)
1 x 0,5 ml	CONTROL + nDNA	Régulateur positif ADNn Contient du sérum humain.
1 x 0,5 ml	CONTROL -	Régulateur négatif. Contient du sérum humain.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB	Conjugué d'anticorps FITC pour l'IgG humain contenant du Bleu Evans. (2x REF 1106-2, 1106-6) Conserver à l'abri de la lumière.
1 x 60 ml	BUF	Solution de dilution
2 fioles	BUF WASH	Solution saline phosphate (PBS). Dissoudre chaque fiole dans un litre.

FR

1 x 5,0 ml

MOUNTING MEDIUM

Milieu de montage Ne pas congeler. (2x **REF** 1106-2, 1106-6)

1 x 12

COVER SLID

Lamelles de protection (2x **REF** 1106-2, 1106-6)

Composants en option

5 ml

IgG-CONJ FITC

Conjugué FITC anti-IgG humaines. Maintenir à l'abri de la lumière. **REF** 2100X.

1 ml

EVANS

Contre-coloration bleu d'Evans*. **REF** 2510.

Symboles utilisés sur les étiquettes:



Numéro de Lot



Numéro catalogue



Utilisation à diagnostic in vitro



A utiliser avant :



Température de stockage



Consulter les instructions d'emploi



Nombre de tests



Fabricant



Date de fabrication



*Danger. Peut provoquer le cancer. Se procurer les instructions avant utilisation. Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/ aerosols. EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage. Garder sous clef. Éliminer le contenu/récipient dans l'élimination des déchets approuvée

Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Boite de coloration (p. ex. Tube de Coplin)
- Petites éprouvettes (par exemple 13 x 75 mm) et râtelier à éprouvettes eau distillée ou désionisée
- Récipient de 1 litre
- Flacon-laveur
- Serviettes de papier absorbant
- Chambre d'incubation

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Destiné à un usage diagnostique in vitro Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Tous les échantillons de sérum humain et les substances dérivées de l'être humain devraient être traités comme étant potentiellement dangereux, sans égard pour leur origine. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux¹⁴.

AVERTISSEMENT - L'azide de sodium (NaN_3) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue de Immco™. Ne pas utiliser après l'expiration de la date de péremption.

RÉCOLTE DES ÉCHANTILLONS ET MANIPULATION

Seuls des échantillons de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des échantillons grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les échantillons à 2 – 8 °C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage

FR

plus long, les spécimens de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROCÉDURE MÉTHODE DE TEST

A. Dépistage

1. Diluez chaque échantillon patient 1:10 avec la solution de dilution fournie (10 µl sérum + 90 µl diluant). Ne pas diluer les régulateurs positif ou négatif. Conserver du sérum non dilué pour déterminer des titres d'anticorps si les tests de dépistage apparaissent être positifs.
2. Laisser les sachets qui contiennent les lames de substrat atteindre la température ambiante pendant 10-15 minutes. Retirer avec soin les lames sans toucher le substrat.
3. Étiqueter les lames et les placer dans une chambre d'incubation entourée de serviettes en papier humidifiées avec de l'eau pour empêcher le séchage.
4. Renverser la fiole compte-gouttes et appuyer doucement pour appliquer 1 goutte (approximativement 50 µl) de régulateur négatif au puits #1. De la même façon, appliquer 1 goutte de régulateur positif au puits #2. Éviter de faire déborder les puits.
5. En utilisant une micropipette ou une pipette Pasteur, appliquer 1 goutte de sérum de patient dilué (approximativement 50 µl) aux autres puits. Éviter de faire déborder les puits.
6. Placer le couvercle sur la chambre d'incubation et incubé les lames pendant 30 minutes à température ambiante.
7. Retirer une lame de la chambre d'incubation. Tenir l'extrémité et rincer doucement avec approximativement 10 ml PBS en utilisant une pipette, ou rincer la lamelle dans un béccher rempli de PBS. Ne pas utiliser de flacon- laveur. Transférer immédiatement la lame dans le tube de Coplin et laver pendant 10 minutes. Refaire le même processus avec toutes les lames restantes.
8. Enlever les lames du tube de Coplin. Sécher le bord de la lame sur une serviette en papier pour enlever le PBS en excédent. Placer la lame dans la chambre d'incubation. Renverser immédiatement la fiole compte- gouttes de conjugué et appuyer doucement pour appliquer 1 goutte (approximativement 50 µl) à chaque puits.
9. Recommencer les étapes 7 et 8 pour chaque diapositive.
10. Remettre le couvercle sur la chambre d'incubation. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
11. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, plonger la lame dans un béccher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration rempli de PBS pendant 10 minutes. Si un supplément de conjugué sans contre-coloration est utilisé (voir composé en option dans la Section Matériel Fourni), 2-3 gouttes de contre-coloration bleue d'Evans peuvent être ajoutée au lavage final. Répéter les opérations avec toutes les lames. REMARQUE: Un lavage incorrect peut augmenter le bruit de fond de fluorescence.
12. Retirer une lame de la boîte de coloration. Sécher le bord de la lame sur une serviette en papier pour enlever le PBS en excédent **Pour empêcher le séchage de la lame, poursuivre immédiatement en réalisant l'étape suivante pendant que la lame est encore mouillée.**
13. Monter la lamelle de protection en y appliquant 3 gouttes de milieu de montage et placer la sur la lame. Éviter d'exercer une pression trop forte et éviter tout mouvement latéral de la lamelle de protection.
14. Recommencer les étapes 12 et 13 pour chaque lame.
15. Utiliser un microscope à fluorescence avec un grossissement de 200x ou supérieur pour la visualisation des résultats.

Les lames peuvent être lues dès qu'elles sont préparées. Cependant, en raison de la présence d'un agent évitant la diminution de l'intensité du signal lumineux dans le milieu de montage, aucune perte significative de l'intensité de la coloration ne se produit si la lecture est effectuée après plus de 48 heures. Les lames doivent être stockées dans l'obscurité à 2-8°C.

B. Détermination du critère d'évaluation (titrage)

Un sérum positif dans le test de dépistage peut être testé davantage en suivant les étapes 5 à 13 pour déterminer le titre. Chaque passage du test doit inclure les régulateurs positifs et négatifs. Faire des dilutions en double en double qui commencent à 1:10. La plus forte dilution produisant une réaction positive correspond au titre.

Préparation des dilutions en série

Numéroter six éprouvettes de 1 à 6. Ajouter 0,9 ml de diluant d'échantillon à l'éprouvette 1 et 0,2 ml aux éprouvettes de 2 à 6. Pipeter 0,1 ml de sérum non-dilué dans l'éprouvette 1 et mélanger soigneusement. Transférer 0,2 ml du tube 1 au tube 2 et mélanger soigneusement. Continuer à transférer 0,2 ml d'une éprouvette à l'autre après avoir mélangé pour produire les dilutions figurant dans le tableau suivant :

Éprouvettes	1	2	3	4	5	6
Sérum	0,1 ml					
	+					
Solution de dilution	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
	↻	↻	↻	↻	↻	

Transfer	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilution finale	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160 1:320 etc.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un régulateur positif et un régulateur négatif doivent être inclus à chaque étape du test. Le régulateur négatif ne doit pas présenter de fluorescence spécifique du kinétoplaste, alors que le régulateur positif doit présenter une intensité de coloration 2+ ou supérieure pour cette structures.

Si les résultats attendus ne sont pas obtenus, l'opération doit être recommencée. Si des résultats inadéquats continuent à se manifester avec les régulateurs, cela peut être dû à :

- Turbidité. Jeter et utiliser un autre contrôle
- Problèmes avec le système optique du microscope à fluorescence. Ceux-ci peuvent comprendre : alignement incorrect, ampoule au-delà de sa durée de vie prévue, etc.,
- Permettre à la lame de sécher pendant la procédure.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des tests pour les anticorps anti-ADNn doivent être rapportés comme étant négatifs (< 10), positifs (supérieur ou égal à 320) ou alternativement positifs avec titre.

Ne lire que les champs qui contiennent le *C. luciliae* bien séparé. Observer la coloration spécifique du kinétoplaste (consulter la figure 1 à la fin du présent document). La coloration du noyau ou du corps polaire ne devrait pas être interprété comme un test anticorps ADN positif. L'absence de coloration spécifique du kinétoplaste est considérée comme étant négative pour les anticorps anti-ADNn.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Dans certains cas, le sérum positif pour la coloration du kinétoplaste peut se révéler très faible ou négatif pour la dilution de dépistage du phénomène de prozone. Dans de tels cas douteux, le sérum doit être testé à des dilutions plus élevées et, s'il est positif, les titres de l'anticorps doivent être déterminés.

Dans de rares cas, de fausses réactions positives peuvent être observées. Ceci peut être dû à la présence de hauts niveaux de lipoprotéines ou d'autres protéines qui se lient à l'ADN¹²⁻¹³.

Le conjugué d'anticorps pour l'IgG humain FITC fourni dans cet équipement est essentiellement spécifique des chaînes lourdes mais présente également quelque activité relatives aux chaînes légères. Il réagit essentiellement avec les anticorps de la classe IgG, mais peut, à un degré moindre, réagir avec les chaînes légères d'autres classes telles qu'IgM.

Le clinicien devrait tenir compte des résultats de tous les tests par immunofluorescence indirecte positifs sur la base des résultats d'autres essais de laboratoire et de la condition clinique du malade quand il pose un diagnostic.

VALEURS ATTENDUES

Comme le montre le tableau 1 à la fin de ce document, les anticorps anti-ADNn ne sont pas détectés (titre < 10) dans le sérum de sujets normaux ou de malades présentant une sclérodermie ou une polyarthrite rhumatoïde. Les anticorps anti-ADNn (titre >10) se manifestent chez la moitié des patients présentant un lupus érythémateux systémique.

DONNÉES DE RENDEMENT

Le test anticorps anti ADNn Immuglo™ a été comparé avec un autre test par anticorps fluorescent disponible dans le commerce qui utilise la *C. luciliae* comme substrat. La comparaison inclut 106 échantillons de sérum provenant de sujets normaux de même que de patients présentant un diagnostic de lupus érythémateux systémique ou de polyarthrite rhumatoïde. Les sérums ont été testés conformément à la procédure et à la dilution de dépistage recommandée par le fabricant. Ceux-ci ont donné des résultats comparables comme cela figure dans le tableau 2.

Test Anticorpi Anti-DNA nativo (nDNA)

Substrato *Crithidia luciliae*

IVD Per uso diagnostico in vitro

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1106-48 Determinazioni

REF 1106-2-96 Determinazioni

REF 1106-6-120 Determinazioni

FINALITÀ D'USO

Test di immunofluorescenza indiretta (IF) per la rilevazione e la quantificazione di anticorpi anti-acido desossiribonucleico nativo (nDNA) nel siero umano.

Sommario e spiegazione del test

Gli anticorpi anti-nDNA sono specifici per il lupus eritematoso sistemico (LES) e si riscontrano raramente in pazienti con artrite reumatoide, sclerodermia e altre patologie autoimmuni¹. La frequenza e il titolo di questi anticorpi possono fluttuare a seconda dell'attività della malattia e gli anticorpi possono scomparire con l'inizio del trattamento immunosoppressivo o durante la fase di remissione. Esiste una buona correlazione tra l'attività della malattia e i livelli degli anticorpi anti-nDNA²⁻⁸.

Le due metodologie impiegate maggiormente per l'individuazione degli anticorpi anti-nDNA sono la radioimmunoanalisi e l'immunofluorescenza. La specificità e la sensibilità del metodo in immunofluorescenza su *Crithidia luciliae* sono comparabili o addirittura migliori di quelle ottenute con la radioimmunoanalisi^{9,10}. Il test di immunofluorescenza indiretta che utilizza *Crithidia luciliae* come substrato antigenico è un metodo semplice e specifico per la rilevazione degli anticorpi anti-nDNA¹¹. L'emoflagellato *Crithidia luciliae* contiene un chinetoplasto, un organetto costituito da DNA circolare compatto che reagisce con una fluorescenza brillante verde mela quando il campione analizzato è positivo.¹²

PRINCIPI DELLA METODICA

Il metodo in immunofluorescenza indiretta adottato in questo kit prevede che i sieri dei pazienti siano incubati su strisce di *Crithidia luciliae* per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Gli anticorpi non legati sono rimossi mediante lavaggio e quelli legati, di classe IgG sono individuati per incubazione del substrato con coniugato anti-IgG umane marcato con fluoresceina. All'osservazione per microscopia in fluorescenza usando filtri idonei, le reazioni positive appaiono come una fluorescenza verde mela del chinetoplasto con o prive di colorazione nucleare associata^{12,13}. Il titolo, che è il valore reciproco della diluizione maggiore che produce una reazione positiva, viene determinato analizzando le diluizioni seriali¹³.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8 ° C. E' necessario, prima dell'uso, portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.

Materiali forniti

Kit nDNA ImmuGlo™ **REF** 1106

Kit nDNA ImmuGlo™ **REF** 1106-2

Kit nDNA ImmuGlo™ **REF** 1106-6

Il kit contiene reagenti sufficienti ad eseguire 48 determinazioni ciascuno.

8 x	SORB SLD 6	Vetrini da 6 pozzetti, substrato <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106)
16 x	SORB SLD 6	Vetrini da 6 pozzetti, substrato <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106-2)
20 x	SORB SLD 6	Vetrini da 6 pozzetti, substrato <i>Crithidia luciliae</i> (REF 1106-6)
1 x 0,5 ml	CONTROL + nDNA	Controllo Positivo nDNA. Contiene siero umano.
1 x 0,5 ml	CONTROL -	Controllo Negativo. Contiene siero umano.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB	Coniugato FITC anti-IgG umane con Blu di Evans. Proteggere dalla luce. (2x REF 1106-2, 1106-6)
1 x 60 ml	BUF	Diluente tamponato.
2 fiales	BUF WASH	Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). Da ricostituire a 1 litro.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM	Liquido di montaggio. Non congelare. (2x REF 1106-2, 1106-6)

IT

1 x 12 COVER|SLD

Vetrini coprioggetto. (2x REF 1106-2, 1106-6)

Componenti opzionali

5 ml IgG-CONJ|FITC

Coniugato FITC anti IgG umane. Proteggere dalla luce. REF 2100X.

1 ml EVANS

Colorante di contrasto Blu di Evans*. REF 2510.

Simboli utilizzati sulle etichette


LOT Codice del lotto


REF Numero di catalogo

IVD Per uso diagnostico *in vitro*


 Utilizzare entro

 Temperatura di conservazione

 Consultare le istruzioni per l'uso

 Numero di test

 Fabbricante

 Data di fabbricazione



*Pericolo. Può provocare il cancro. Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. Conservare sotto chiave. Smaltire il prodotto/recipiente nello smaltimento dei rifiuti approvato.

Materiali necessari ma non forniti

- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta Pasteur
- Pipette sierologiche
- Vaschetta per colorazione (ad es. vaschetta Coplin)
- Provette piccole per test (ad es. 13 x 75 mm) e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro
- Flacone di lavaggio
- Salviette di carta
- Camera umida per l'incubazione

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia i derivati del sangue umano e i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali¹⁴.

ATTENZIONE - L'azide sodica (NaN₃) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questa procedura usare unicamente campioni di siero. I campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati a -20°C. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

IT PROCEDURA

Metodo del test

A. Screening

1. Diluire il siero del paziente 1:10 con il Diluente Tamponato fornito (10 µl di siero + 90 µl di diluente). Non diluire i Controlli Positivi o Negativi. Conservare il siero non diluito per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
 2. Lasciare che le buste contenenti i vetrini raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti. Rimuovere con attenzione il vetrino senza venire in contatto con il substrato.
 3. Contrassegnare i vetrini e disporli nella camera umida sul cui piano interno saranno state poste delle salviette di carta inumidite con acqua per prevenire l'essiccazione.
 4. Applicare 1 goccia (circa 50 µl) di Controllo Negativo nel pozzetto #1. Allo stesso modo applicare 1 goccia di Controllo Positivo nel pozzetto #2. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
 5. Usando una micropipetta o pipetta Pasteur, applicare 1 goccia di siero diluito del paziente (circa 50 µl) negli altri pozzetti. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
 6. Posizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
 7. Rimuovere il vetrino dalla camera umida, reggerlo per l'estremità e irrorare delicatamente con circa 10 ml di PBS usando una pipetta, oppure sciacquare il vetrino in un recipiente contenente PBS. Non usare flaconi di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino in una vaschetta Coplin di lavaggio e attendere per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
 8. Rimuovere il/i vetrino/i dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. Posizionare il vetrino nella camera umida. Applicare immediatamente 1 goccia (circa 50 µl) di Coniugato in ciascun pozzetto.
 9. Ripetere le fasi **7 e 8** per ciascun vetrino.
 10. Riposizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
 11. Rimuovere il vetrino dalla camera umida, reggerlo per l'estremità e immergerlo in un recipiente contenente PBS per rimuovere il coniugato in eccesso. Lasciare il/i vetrino/i per 10 minuti in una vaschetta Coplin riempita con PBS. Nel caso venga usato un coniugato opzionale, privo di colorante di contrasto (vedere componenti opzionali nella sezione Materiali Forniti), possono essere aggiunte 2-3 gocce di Blu di Evans nel lavaggio finale. Ripetere la procedura per i restanti vetrini. NOTA: Un lavaggio inadeguato può causare un aumento nella fluorescenza di fondo.
 12. Rimuovere il vetrino dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. **Per prevenire l'essiccazione, procedere immediatamente alla fase successiva mentre il vetrino è ancora umido.**
 13. Montare il vetrino coprioggetto applicando **3 gocce** di liquido di montaggio uniformemente sul coprioggetto e posizionarlo sopra il vetrino. Evitare di esercitare una pressione eccessiva e gli spostamenti laterali del vetrino coprioggetto.
 14. Ripetere le fasi 12 e 13 per ciascun vetrino.
 15. Esaminare la fluorescenza specifica mediante microscopia in fluorescenza con ingrandimento 200x o superiore.
- I vetrini possono essere letti appena montati. Tuttavia, per la presenza di un agente antiscolorimento nel liquido di montaggio, non si verificano perdite significative di intensità di colorazione e la lettura può essere effettuata nelle 48 ore successive alla preparazione. I vetrini devono essere conservati in assenza di luce a 2-8°C.

B. Determinazione Endpoint (titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere analizzato ulteriormente ripetendo le fasi da 5 a 13 per determinare il titolo anticorpale. Ogni serie di test deve includere Controlli Positivi e Negativi. Preparare diluizioni seriali a partire da 1:10. Il reciproco del valore della più alta diluizione a cui il campione mostra positività è il valore del titolo.

Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare 6 provette da 1 a 6. Aggiungere 0,9 ml di Diluente del Campione nella provetta 1 e 0,2 ml nelle provette da 2 a 6. Pipettare 0,1 ml di siero non diluito nella provetta 1 e mescolare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta alla successiva, dopo la miscelazione, per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

Provette	1	2	3	4	5	6
Siero	0,1 ml					
	+					
Diluente Tamponato	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Trasferimento	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Diluizione finale	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

IT

CONTROLLO di QUALITÀ

In ogni serie di test dovrebbero essere inclusi un Controllo Positivo e un Controllo Negativo. Il Controllo Negativo non dovrebbe evidenziare fluorescenza specifica del chinetoplasto, mentre il Controllo Positivo dovrebbe produrre un'intensità di colorazione di 2+ o maggiore di questa struttura. Se non si ottengono i risultati attesi, la procedura dovrebbe essere ripetuta. Se i controlli continuano a produrre risultati discordanti, ciò può essere dovuto a:

- Torbidità. Smaltire e usare un nuovo controllo.
- Problemi legati al sistema ottico del microscopio a fluorescenza: allineamento non idoneo, lampada oltre la durata utile prevista, ecc.
- Aver lasciato asciugare il vetrino durante la procedura.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dei test per gli anticorpi anti-*n*DNA dovrebbero essere riportati come negativi con titolo inferiore a 10, positivi con titolo maggiore o uguale a 320 o, in alternativa, positivi con titolo endpoint specifico.

Leggere unicamente i campi contenenti *C. luciliae* ben separato. Osservare la colorazione specifica del chinetoplasto (vedere figura 1 alla fine di questo foglio illustrativo). La colorazione del nucleo o del corpo polare non dovrebbe essere interpretata con un risultato positivo del test. L'assenza di colorazione specifica del chinetoplasto viene considerata un esito negativo della presenza di anticorpi anti-*n*DNA.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

In alcuni casi, i sieri positivi per la colorazione dei chinetoplasti possono essere o molto deboli o negativi alla diluizione iniziale di screening (fenomeno prozona). In questi casi incerti, i sieri dovrebbero essere analizzati a diluizioni maggiori e, se positivi, dovranno essere determinati i titoli anticorpali.

In casi rari, si possono osservare reazioni falso-positive che possono essere dovute alla presenza di livelli elevati di lipoproteine o di altre proteine che si legano al DNA.¹²⁻¹³

Il Coniugato FITC anti-IgG umana caprina fornito in questo kit è prevalentemente specifico per le catene pesanti ma presenta anche una certa attività con le catene leggere. Reagisce maggiormente con gli autoanticorpi di classe IgG, ma può, in misura inferiore, reagire con le catene leggere di altre classi, ad esempio le IgM.

Per la formulazione della diagnosi, i medici dovrebbero valutare i risultati positivi dei test di immunofluorescenza indiretta insieme ai risultati di altre analisi di laboratorio e alle condizioni cliniche del paziente.

VALORI ATTESI

Come si può vedere dalla Tabella 1 inclusa alla fine di questo foglio, gli anticorpi anti-*n*DNA non sono rilevati (titolo <10) nei sieri di individui normali o di pazienti affetti da sclerodermia o da artrite reumatoide. Gli anticorpi anti-*n*DNA occorrono invece (titolo >10) in più della metà dei pazienti con LES.

PERFORMANCE DEL TEST

Il Test di Rilevazione degli Anticorpi anti-*n*DNA in Immunofluorescenza ImmuGlo™ è stato confrontato con un altro test in fluorescenza disponibile in commercio che usa come substrato *C. luciliae*. La comparazione ha incluso 106 campioni di siero prelevati da individui normali e da pazienti con diagnosi di LES, sclerodermia o artrite reumatoide, i sieri sono stati testati secondo la procedura e le diluizioni di screening consigliate dai produttori. Questi test hanno prodotto i risultati riassunti nella Tabella 2.

Teste de Anticorpos Anti-ADN nativo (*nADN*)

Substrato *Crithidia luciliae*

IVD Para diagnóstico in vitro

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1106 48 Determinações

REF 1106-2 96 Determinações

REF 1106-6 120 Determinações

APLICAÇÃO

Teste de anticorpos de imunofluorescência indirecta para a detecção e semiquantificação de anticorpos anti-ácido desoxirribonucleico (cadeia dupla) nativo (*nADN*) no soro humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos anti-*nADN* são específicos para o Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) e ocorrem raramente nos doentes com artrite reumatóide, esclerodermia ou outras doenças auto-imunes¹. A frequência e o título destes anticorpos flutuam com a actividade da doença e tendem a desaparecer com um tratamento imunossupressor e durante a remissão. Existe uma boa correlação entre a actividade da doença e os níveis de anticorpos anti-*nADN*²⁻⁸.

Os dois métodos geralmente mais utilizados para detectar anticorpos anti-*nADN* são o radioimunoensaio e a imunofluorescência. A especificidade e a sensibilidade do método de imunofluorescência em substrato *Crithidia luciliae* são comparáveis, ou mesmo melhores, do que o radioimunoensaio⁹⁻¹⁰. O teste de imunofluorescência indirecto que usa *Crithidia luciliae* como substrato antigénico é um método simples e específico para detectar anticorpos anti-*nADN*.¹¹ *Crithidia luciliae* contém um cinetoplasto, um organelo que consiste em ADN circular compacto que reage com cor verde-maçã brilhante quando a amostra do teste dá resultado positivo.¹²

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

No método de imunofluorescência indirecto usado neste kit, o soro dos doentes é incubado em esfregaços de *Crithidia luciliae* para permitir a ligação de anticorpos ao substrato. Quaisquer anticorpos que não se tenham ligado são eliminados pela lavagem. Os anticorpos que se ligam, da classe IgG, são detectados através da incubação do substrato com conjugado de IgG anti-humana marcado com fluoresceína. Quando observadas ao microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados, as reacções positivas apresentam-se como uma fluorescência verde-maçã do cinetoplasto com ou sem coloração nuclear associada¹²⁻¹³. O título, que é recíproco da maior diluição dando uma reacção positiva, é determinado testando diferentes diluições¹³.

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

Conservação e preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. Os reagentes estão prontos a usar depois de terem estabilizado à temperatura ambiente.

Materiais fornecidos

Kit para nDNA ImmuGlo™ **REF** 1106

Kit para nDNA ImmuGlo™ **REF** 1106-2

Kit para nDNA ImmuGlo™ **REF** 1106-6

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 48 determinações.

8 x	[SORB SLD 6]	Lâminas de substrato <i>Crithidia luciliae</i> com 6 poços (REF 1106)
16 x	[SORB SLD 6]	Lâminas de substrato <i>Crithidia luciliae</i> com 6 poços (REF 1106-2)
20 x	[SORB SLD 6]	Lâminas de substrato <i>Crithidia luciliae</i> com 6 poços (REF 1106-6)
1 x 0,5 ml	[CONTROL+ nDNA]	Controlo positivo para nADN. Contém soro humano.
1 x 0,5 ml	[CONTROL-]	Controlo negativo. Contém soro humano.
1 x 5 ml	[IgG-CONJ FITC EB]	Conjugado de IgG anti-humana com FITC contendo azul de Evans. Proteger da luz. (2x REF 1106-2, 1106-6)
1 x 60 ml	[BUF]	Diluyente tamponado.
2 frascos	[BUF WASH]	Tampão fosfato salino (PBS). Dissolver cada frasco em 1 l.

PT

1 x 5,0 ml

MOUNTING MEDIUM

Meio de montagem. Não congelar. (2x REF 1106-2, 1106-6)

1 x 12

COVER SLID

Lamelas. (2x REF 1106-2, 1106-6)

Componentes opcionais

5 ml

IgG-CONJ FITC

Conjugador de IgG anti-humana IgG com FITC. Proteger da luz. REF 2100X.

1 ml

EVANS

Contracorante azul de Evans. REF 2510.

Símbolos utilizados nos rótulos:



Número de lote



Número de catálogo



Utilização diagnóstica *in vitro*



Utilização por



Temperatura de armazenamento



Consulte as instruções de utilização



Número de testes



Fabricante



Data de fabricação



*Perigo. Pode provocar cancro. Pedir instruções específicas antes da utilização. Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico. Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. Armazenar em local fechado à chave. Armazenar em local fechado à chave. Eliminar o conteúdo/recipiente em eliminação de resíduos aprovada.

Material necessário mas não fornecido

- Microscópio de fluorescência
- Micropipeta ou pipeta de Pasteur
- Pipetas serológicas
- Recipiente de coloração (ex: Coplin)
- Tubos de ensaio pequenos (ex: 13 x 75 mm) e suportes para tubos de ensaio
- Água destilada ou desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco de lavagem
- Toalhetes de papel
- Câmara de incubação

AVISOS E PRECAUÇÕES

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados para HbsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram resultado negativo nos testes FDA. Todas as amostras de soro humano e produtos de origem humana devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais¹⁴.

AVISO: A azida de sódio (NaN₃) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação dessas azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

As instruções devem ser seguidas à risca de forma a assegurar resultados válidos. Não trocar componentes dos kits com outros de outras origens diferentes do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Não utilizar se estiverem fora do prazo de validade.

COLHEITA DAS AMOSTRAS E PREPARAÇÃO

Nestas operações só devem ser usadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios podem interferir no rendimento deste teste e não devem ser usadas. Conserve entre 2 e 8 °C por não mais de uma semana. Para uma conservação mais prolongada devem ser congeladas a -20 °C. Evite repetidas congelações e descongelações.

PT PROCEDIMENTO

Método do teste

A. Controlo

1. Dilua cada soro do doente 1:10 com o Diluente Tampão fornecido (10 µl soro + 90 µl Diluente). Não dilua os Controlos Negativo e Positivo. Conserve o soro não diluído para determinar a titulação de anticorpos, se os testes de controlo forem positivos.
2. Deixe que as bolsas com as lâminas de substrato estabilizem à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. Retire as lâminas com atenção sem tocar no substrato.
3. Rotule as lâminas e coloque-as na câmara de incubação revestida com toalhetes de papel humedecidos com água para evitar a secagem.
4. Inverta o frasco conta-gotas e aperte ligeiramente para aplicar 1 gota (cerca de 50 µl) de Controlo Negativo no poço n.º 1. Do mesmo modo, deite 1 gota de Controlo Positivo no poço n.º 2. Não encha demasiado.
5. Com uma micropipeta ou pipeta de Pasteur, deite 1 gota do soro diluído do doente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demasiado os poços.
6. Coloque a tampa na câmara de incubação e incube as lâminas 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Retire a lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina pela extremidade e lave com cerca de 10 ml de PBS usando uma pipeta, ou lave a lâmina numa proveta com PBS. Não use o frasco de lavagem. Transfira imediatamente a lâmina para o recipiente de Coplin e lave 10 minutos. Repita a operação em todas as lâminas restantes.
8. Retire a(s) lâmina(s) do recipiente de Coplin. Limpe as extremidades da lâmina num toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS. Coloque a lâmina na câmara de incubação. Inverta imediatamente o frasco conta-gotas do Conjugado e deite 1 gota (cerca de 50 µl) em cada poço.
9. Repita os passos 7 e 8 para cada lâmina.
10. Coloque a tampa na câmara de incubação. Incube por 30 minutos à temperatura ambiente.
11. Retire uma lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina numa ponta e mergulhe-a num recipiente com PBS para eliminar o excesso de conjugado. Coloque a(s) lâmina(s) num recipiente de coloração com PBS durante 10 minutos. Se optar por usar conjugado sem contrastante (consultar componentes opcionais na secção Materiais fornecidos), poderá adicionar 2 a 3 gotas de contrastante azul de Evans à lavagem final. Repita nas lâminas restantes. NOTA: Uma lavagem deficiente pode levar a um aumento da fluorescência de fundo.
12. Retire a lâmina do recipiente de coloração. Passe o bordo da lâmina num toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS. **Para evitar que a lâmina seque, salte imediatamente ao passo seguinte enquanto a lâmina ainda está húmida.**
13. Monte a lamela aplicando **3 gotas** de Meio de Montagem uniformemente na lamela e coloque-a sobre a lâmina. Não faça muita pressão e evite o deslizamento lateral da lamela.
14. Repita os passos 12 e 13 em cada lâmina.
15. Examine a fluorescência específica com microscópio de fluorescência com aumento de 200x ou mais.

As lâminas devem ser lidas assim que estiverem prontas. Contudo, devido à presença de um agente antidescoloração no meio de suporte, não há perdas significativas de intensidade de coloração, se a leitura for adiada até 48 horas. As lâminas devem ser conservadas às escuras entre 2 e 8°C.

B. Determinação final (titulação)

Um soro positivo no teste de controlo pode ainda ser mais testado seguindo os passos 5 ao 13 para determinar a titulação. Cada teste deve incluir os Controlos Positivo e Negativo. Efectue diversas diluições duplicadas começando por 1:10. O recíproco da diluição mais elevada a produzir uma reacção positiva é o título.

Preparação de diluições em série

Numere seis tubos de 1 a 6. Deite 0,9 ml de Diluente da Amostra no tubo 1 e 0,2 ml nos tubos 2 a 6. Pipete 0,1 ml de soro não diluído para o tubo 1 e mexa bem. Transfira 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e mexa bem. Continue a transferir 0,2 ml de um tubo para o outro após mexer para produzir as diluições descritas na tabela seguinte.

Tubos	1	2	3	4	5	6
Soro	0,1 ml					
	+					
Diluente tampão	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transferir	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Diluição final	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

CONTROLO DE QUALIDADE

Os Controlos Positivo e Negativo devem ser incluídos em cada teste. O Controlo Negativo não deve ter fluorescência específica do cinetoplasto. Deve ter uma intensidade de coloração desta estrutura de 2+ ou maior.

PT

Se não se obtiverem os resultados esperados, o teste deve ser repetido. Se resultados inadequados continuarem a ocorrer com os controlos, pode tratar-se de:

- Turvação. Elimine e use outro controlo.
- Problemas no sistema óptico do microscópio de fluorescência: alinhamento incorrecto, lâmpada a precisar de ser substituída, etc.
- A lâmina ficou seca durante o processo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos testes para anticorpos anti-*n*ADN devem ser registados como negativos (< 10), positivo, (maior ou igual a 320) ou alternadamente positivo com título.

Leia apenas os campos que contêm *C. luciliae* bem separado. Observe a coloração específica do cinetoplasto (veja a figura 1 no fim deste documento). A coloração do núcleo ou do corpo polar não deve ser interpretada como um teste de anticorpos anti-ADN positivo. A ausência de coloração específica do cinetoplasto é considerada negativa para anticorpos anti-*n*ADN.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Nalguns casos, o soro positivo em coloração do cinetoplasto poderá também ser muito fraco ou negativo no fenómeno pró-zona da diluição de controlo inicial. Nesses casos duvidosos o soro deve ser controlado em diluições mais elevadas e, se positivo, determinada a titulação dos anticorpos.

Em casos raros podem ser observadas reacções positivas falsas. Essas podem ser devidas à presença de níveis elevados de lipoproteínas ou outras proteínas que aderem ao ADN¹²⁻¹³.

O Conjugado de IgG anti-humana de cabra com FITC fornecido com este kit é principalmente específico de cadeia pesada mas tem uma ligeira actividade de cadeia leve. Esse reage principalmente com auto-anticorpos de classe IgG, mas pode, num grau inferior, reagir com cadeias leves de outras classes, tais como IgM.

Quando redigir um diagnóstico, o médico deve considerar os resultados de todos os testes de imunofluorescência indirecta positivos em conjunto com os resultados de outros testes de laboratório e a condição clínica do doente.

VALORES PREVISTOS

Como visto na tabela 1, no fim deste documento, os anticorpos anti-*n*ADN não são detectados (título < 10) no soro de indivíduos saudáveis ou doentes com esclerodermia ou artrite reumatóide. Os anticorpos anti-*n*ADN anticorpos apresentam-se (título > 10) em mais de metade dos doentes com LES.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O teste de Anticorpos Anti-*n*ADN ImmuGlo™ foi comparado com outro teste de anticorpos a fluorescência adquirido no mercado usando *C. luciliae* como substrato. A comparação incluiu 106 amostras de soro de indivíduos saudáveis bem como de doentes com diagnóstico de LES, esclerodermia ou artrite reumatóide. Os soros foram testados de acordo com o método e diluição de controlo recomendados pelo fabricante. Estes resultados de comparação estão descritos na tabela 2.

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Feltkamp TEW (Ed). The significance of the determination of anti-DNA and DNA/anti-DNA complexes. Scand J Rheumatol Suppl. 1975;11:7-64.
2. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv Immunol. 1989; 44:93-151.
3. Tzioufas AG, Manoussakis MN, Drosos AA et al. Enzyme immunoassays for the detection of IgG and IgM anti-dsDNA antibodies: clinical significance and specificity. Clin Exp Rheumatol. 1987; 5:247-253.
4. Ruffati A, Calligaro A, Ross D et al. Anti-double stranded DNA antibodies in the healthy elderly: prevalence and characteristics. J Clin Immunol. 1990; 10:300-303.
5. Kadlubowski M, Jackson M, Yap PL and Neill G. Lack of specificity for antibodies to double stranded DNA found in four commercial kits. J Clin Path. 1991; 44:246-250.
6. Brinkman K, Termaat R, Van den Brink H et al. The specificity of the anti-dsDNA ELISA: a closer look. J Immunol Methods. 1991; 13:91-100.
7. Lange A. Evaluation of the simultaneous estimation of anti-dsDNA and anti-ssDNA antibodies for clinical purposes. Clin Exp Immunol. 1978; 31:472-481.
8. Borg EJ, Horst G, Hum EJ et al. Measurement of increases in antidouble stranded DNA antibody level as a predictor of disease exacerbation in systematic lupus erythematosus: a long term, prospective study. Arth Rheum. 1990; 33:634-643.
9. Aarden LA, Lakmaker F, de Groot ER, et al.: Detection of antibodies to DNA by radioimmunoassay and immunofluorescence. Scand. J. Rheu. 1975; Suppl. 11:12-19.
10. Fish F, Ziff M: A sensitive solid phase microradioimmunoassay for anti double-stranded DNA antibodies. Arthritis and Rheumatism 1981; 24:534-543.
11. Aarden LA, de Groot ER, Feltkamp TE: Immunology of DNA. III. *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the detection of anti-dsDNA with immunofluorescence techniques. Ann. NY Acad. Sei. 1975; 254: 505-515.
12. Crowe W, Kusher I: An immunofluorescent method using *Crithidia luciliae* to detect antibodies to double-stranded DNA. Arthritis and Rheumatism 1977; 20:811-814.
13. Feltkamp TE, Kirkwood TB et al. The first international standard for antibodies to double stranded DNA. Ann Rheum Dis. 1988; 47:740-746.
14. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control/National Institute of Health, Fourth Edition, 1999, (HHS Pub. # (CDC) 93-8395).

Figure 1.C. luciliae

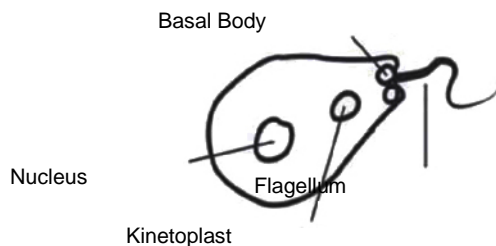


Table 1. Incidence of Antibodies to *n*DNA in Collagen-Vascular Disorders as detected by Indirect Immunofluorescence on *C. luciliae*

Clinical Condition	No. Tested	No. Positive	% Positive
SLE	28	19	68
Scleroderma	23	0	0
Rheumatoid Arthritis	8	0	0
Normal Controls	106	0	0

Table 2. Comparison of Kits using *C. luciliae* Substrate for the Detection of Antibodies to *n*DNA

Clinical Condition	n	Immco™		Other	
		Positive	% Positive	Positive	% Positive
SLE	28	19	68	13	46
Scleroderma	23	0	0	0	0
Rheumatoid Arthritis	8	0	0	0	0
Normal Controls	106	0	0	0	0

For technical assistance please contact:



 **IMMCO Diagnostics, Inc.**
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120 USA
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immco.com
or your local product distributor



EMERGO Europe.
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands