



SISTEMA DE ANÁLISIS DE ADNn COLORZYME®

Para uso diagnóstico in vitro
Para El Uso Profesional

USO PREVISTO: Se trata de una determinación enzimática indirecta para la detección semicuantitativa de anticuerpos anti-ADNn en suero humano. Este sistema de análisis sirve de ayuda para el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

“Anticuerpo antinuclear (ANA)” es un término general que se emplea para referirse a los autoanticuerpos dirigidos contra diversas proteínas del núcleo celular. En los primeros estudios sobre estos autoanticuerpos, realizados con técnicas de inmunofluorescencia, se observaron determinados detalles de unas pocas proteínas del núcleo (1). A la vista de la elevada correlación entre la presencia de ANA y el lupus eritematoso sistémico (LES), basta con que no estén presentes para descartar la enfermedad (2).

Aunque los anticuerpos específicos del ADN siguen mostrando una elevada correlación con el LES (3), en el último decenio se han detectado algunas macromoléculas nucleares (4) y citoplásmicas (5-7) asociadas a otras enfermedades del tejido conjuntivo (8-10). Como quiera que algunos de estos autoanticuerpos parecen útiles para el diagnóstico y pronóstico de la esclerosis sistémica progresiva (11-12), las enfermedades mixtas del tejido conjuntivo (13-15), el síndrome de Sjögren (16-17), la polimiositis (18) y la artritis reumatoide (19) en la actualidad el análisis ANA se admite como herramienta general para la detección selectivas de las enfermedades del tejido conjuntivo (20).

Los pacientes con LES pueden producir anticuerpos contra diversos antígenos nucleares, pero los anticuerpos contra el antígeno Sm (Smith) y contra el ADNn muestran la máxima correlación con la enfermedad (20). Los anticuerpos anti-Sm adoptan un patrón de tinción de ANA moteado, mientras que los anti-ADNn adoptan un patrón homogéneo. Aunque es frecuente que haya niveles bajos de anticuerpos anti-ADNn en el suero de pacientes con artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica progresiva, dermatomiositis, lupus eritematoso discoide y enfermedades mixtas del tejido conjuntivo (21), prácticamente sólo son elevados en el LES. Se cree que los anticuerpos anti-ADNn intervienen en la patogenia de las formas más graves de LES, cuando se depositan como inmunocomplejos (22). Los anticuerpos anti-ADNn alcanzan títulos elevados y, como se correlacionan con la actividad de la enfermedad (23), su detección es importante en el tratamiento de los pacientes con LES.

Se ha demostrado que la inmunofluorescencia indirecta supone un problema para algunos laboratorios debido al pequeño tamaño del microorganismo *Crithidia luciliae*, a menos que se emplee un equipo óptico y fluorescente de gran calidad. Debido a eso y a la necesidad de reducir los problemas de reproducibilidad entre laboratorios inherentes a la microscopía por fluorescencia se ha creado el sistema de análisis de anticuerpos anti-ADNn de Immuno Concepts.

El anticuerpo sérico que reacciona con el ADNn se detecta por la tinción del cinetoplasto situado en el interior de microorganismo *Crithidia luciliae* (24). *C. luciliae* es un parásito de la mosca azul no patógeno para los seres humanos. El cinetoplasto de estos hemoflagelados forma parte de la gran mitocondria en la que se concentra el ADNn helicoidal (24-25). En microfotografías electrónicas, el cinetoplasto aparece como una estructura ligeramente cóncava y discoide que contiene crestas mitocondriales y una masa de ADN fibroso (26). El cinetoplasto se encuentra entre el núcleo, localizado en el centro, y el cuerpo basal del flagelo. Como el ADNn del cinetoplasto no contiene contaminantes de

ADN monocatenario (ADNmc), en teoría se eliminan los posibles problemas de falsos positivos por reacción con el ADNmc que se pueden producir en el radioinmunoanálisis de ANA de timo de ternera (25, 27-31).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El sistema de análisis de anticuerpos anti-ADNn Colorzyme® de Immuno Concepts emplea la técnica indirecta de detección enzimática de anticuerpos. Las muestras de los pacientes se incuban con un sustrato antigénico que permite la unión específica de los autoanticuerpos al ADNn del cinetoplasto. Si hay anticuerpos anti-ADNn, se forma un complejo antígeno-anticuerpo estable. Tras el lavado para retirar los anticuerpos unidos de forma inespecífica, se incuba el sustrato con un reactivo de anticuerpo antihumano conjugado con peroxidasa de rábano. Si los resultados son positivos se forma un complejo estable con tres partes: el anticuerpo marcado con la enzima unido al anticuerpo anti-ADNn humano, unido a su vez al antígeno anti-ADNn. Este complejo se puede ver incubando el portaobjetos en el reactivo de color, que contiene un sustrato específico de la enzima. La reacción entre el anticuerpo marcado con la enzima y el sustrato específico de la enzima da una reacción de color visible en el portaobjetos con un microscopio óptico estándar. En las muestras positivas, el cinetoplasto mostrará una tinción de color azul-morado oscuro en el interior de los microorganismos de *Crithidia luciliae*. Si la muestra es negativa para los anticuerpos anti-ADNn, el cinetoplasto no mostrará fluorescencia.

COMPONENTES DEL SISTEMA - MATERIALES SUMINISTRADOS

Utilización: Todos los componentes se entregan listos para su empleo, sin necesidad de fragmentarlos ni prepararlos (excepto el tampón PBS y el reactivo de color Colorzyme®, que deben ser disueltos en agua desionizada o destilada antes de utilizarlos).

Conservación: Todos los componentes se pueden conservar a 2-10°C. Una vez preparado, el reactivo con tampón PBS debe conservarse en envase cerrado y refrigerado a 2-10°C. Una vez preparado, el reactivo de color Colorzyme® debe ser conservado en envase cerrado a temperatura ambiente durante 30 días como máximo. Dependiendo de la frecuencia de utilización, se pueden utilizar 150 ml de reactivo de color Colorzyme® con un máximo de 20 portaobjetos.

Estabilidad: Todos los componentes son estables al menos durante 12 meses a partir de la fecha de fabricación. No utilice los componentes pasada la fecha de caducidad.

REACTIVOS

Portaobjetos de sustrato:** Portaobjetos con sustrato de ADNn, utilizando *Crithidia luciliae* estabilizado directamente en los pocillos del análisis. El exclusivo diseño de los fosos del portaobjetos reduce al mínimo la contaminación cruzada de los pocillos durante la prueba. La bolsa que contiene el portaobjetos se rellena con un gas inerte no tóxico que contribuye a la estabilidad de las células. Si la bolsa no está inflada al sacar el portaobjetos del kit, significa que la bolsa se ha estropeado y el portaobjetos no debe ser utilizado.

Control positivo: N° de catálogo 3021. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano positivo con anticuerpo específico contra los antígenos ADNn. Este suero produce una brillante reacción de tinción positiva del cinetoplasto o del cinetoplasto y el núcleo del sustrato de *Crithidia luciliae* de Immuno Concepts.

Suero de control titulable: N° de catálogo 3026. Vial listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano positivo que será tratado como si fuera una muestra de paciente sin diluir. Consulte el valor de la titulación en la etiqueta del vial.

Suero de control negativo: N° de catálogo 3031. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano negativo. El suero de control negativo no mostrará tinción específica del cinetoplasto del sustrato de *Crithidia luciliae* de Immuno Concepts.

Reactivo con anticuerpos enzimáticos: N° de catálogo 5009 (9,0 ml), 5075 (23,0 ml). IgG de cabra antihumana (cadenas pesadas y ligeras) conjugadas con peroxidasa de rábano (HRP). El reactivo se presenta listo para usar en frascos con cuentagotas de precisión, con 9,0 ml por cada 10 portaobjetos, en kits de análisis completos.

**Este portaobjetos está protegido por una o más de las siguientes patentes estadounidenses y de otros países: 4387972, D-274261, D-273261, patente canadiense 1171302, y otras patentes en trámite.

Reactivo de color:^{††} N° de catálogo 4066. Polvo de sustrato enzimático específico de HRP, que contiene 4-cloro-1-naftol. Cada envase contiene polvo para formar 150 ml de reactivo de color Colorzyme[®] autoactivable.

Preparación: Disuelva el contenido de una bolsa en 150 ml de agua desionizada o destilada. Mezcle bien hasta que se disuelva por completo. Este reactivo de color es estable durante 30 días a temperatura ambiente en un envase cerrado. Puede ser reutilizado durante 30 días como máximo, o hasta que se aprecie un cambio de color o alguna precipitación. Es normal que al volverlo a utilizar presente turbidez u opalescencia, sin precipitado visible. Dependiendo de la frecuencia de utilización, se pueden utilizar 150 ml de reactivo Colorzyme[®] con un máximo de 20 portaobjetos.

ELEMENTOS NO REACTIVOS

Polvo tampón PBS: N° de catálogo 1011. Polvo salino tamponado con fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contiene polvo tampón suficiente para formar 1 litro. (Los kits de análisis completos llevan una bolsa de polvo tampón por cada cinco portaobjetos).

Preparación: Disuelva una bolsa de polvo tampón en 1 litro de agua desionizada o destilada, tape el recipiente y consérvelo en refrigerador a 2-10°C durante 4 semanas como máximo, o hasta que aparezcan signos de contaminación u otros cambios visibles.

Medio para preparaciones microscópicas semipermanentes: N° de catálogo 1111. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 5,0 ml de medio para preparaciones microscópicas a base de glicerol.

Cubreobjetos: N° de catálogo 1041. Cada envase contiene diez cubreobjetos de vidrio n° 1 de 24x60 mm.

OTROS MATERIALES NECESARIOS - PERO QUE NO SE SUMINISTRAN

Pipetas volumétricas para dispensar volúmenes de 20-25 µl
Tres jarras Coplin o platillos de tinción
Frasco para exprimir o pipetas de Pasteur
Pipetas serológicas
Envases de un litro con tapón de rosca (para el tampón PBS)
Envases cerrados para conservar el reactivo de color Colorzyme[®]
Agua desionizada o destilada
Probetas para preparar las diluciones de suero
Papel secante o toallas de papel
Cámara de incubación
Guantes desechables
Cronómetro
Microscopio óptico estándar capaz de proporcionar aumentos de 200x y 400x

PRECAUCIONES

1. Todos los materiales de procedencia humana utilizados en este producto han sido analizados en busca de anticuerpos con el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), el virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2), el virus de la hepatitis C (VHC) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAG) con métodos aprobados por la FDA, obteniendo resultados negativos (no reactivos en varias ocasiones) en todos los casos. Pero no existe ningún método de análisis que pueda garantizar por completo la ausencia de VIH-1, VIH-2, hepatitis C, hepatitis B u otros agentes infecciosos. Por eso, todos los sueros de control deben ser manipulados como si fueran infecciosos.
2. Todas las muestras de paciente deben ser manipuladas según el nivel 2 de bioseguridad, según se recomienda en el manual de los Centers for Disease Control/National Institutes of Health para toda muestra de suero o sangre humana potencialmente infecciosa: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La disolución de los componentes o su sustitución por otros distintos de los suministrados con el sistema puede arrojar resultados incoherentes.

^{††} Este material está protegido por una o más de las siguientes patentes estadounidenses y de otros países: 4615972, patente canadiense 1231633, patente italiana 1177110, y otras patentes en trámite.

4. Se emplea azida sódica (0,09%) como conservante. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o con las conducciones de cobre y formar sales de azidas metálicas explosivas. Al eliminar los reactivos, lavar con grandes volúmenes de agua del grifo para evitar que queden residuos en las tuberías. La azida sódica es venenosa y puede ser tóxica en caso de ingestión.
5. Este kit es para uso diagnóstico *in vitro*.
6. Si fuera necesario utilizar sueros hemolizados o lipémicos, caliéntelos para inactivarlos a 56°C durante 30 minutos para obtener resultados óptimos. No utilice sueros con contaminación microbiana.
7. El suero de control tituable debe utilizarse para controlar la reproductibilidad entre lotes y entre ciclos. No está concebido para medir la sensibilidad o la especificidad generales del ensayo.
8. Esta prohibido fumar, comer o beber en las zonas de manipulación de las muestras o los reactivos del kit.
9. Evite salpicaduras y la generación de aerosoles en todo momento.
10. Si los tiempos de incubación y las temperaturas no son los especificados, los resultados pueden ser falsos.
11. La contaminación cruzada de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos.
12. Los elementos de vidrio reutilizables deben ser lavados y enjuagados a fondo para eliminar los detergentes antes de su uso. Todos los elementos de vidrio deben estar limpios y secos antes de su uso.
13. Todos los reactivos, portaobjetos y muestras deben estar a temperatura ambiente (18-24°C) antes de su uso.
14. Para manipular las muestras y los reactivos debe utilizar guantes desechables, y cuando acabe deberá lavarse bien las manos.
15. La contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos.
16. No pipetee nunca con la boca y evite el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las mucosas. En caso de contacto, lávese con un jabón germicida y agua abundante.
17. El reactivo de color puede ser reutilizado durante 30 días como máximo, o hasta que se aprecie un cambio de color o alguna precipitación. Es normal que al volverlo a utilizar presente turbidez u opalescencia, sin precipitado visible. Dependiendo de la frecuencia de utilización, se pueden utilizar 150 ml de reactivo de color Colorzyme® con un máximo de 20 portaobjetos.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Obtención: La muestra ideal es suero. Se obtendrán aproximadamente 5 ml de sangre por venipunción aséptica, con un tubo de vacío estéril u otro sistema de obtención adecuado. Deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (18-24°C). Se separará el suero del coágulo por centrifugado cuanto antes, para que la hemólisis sea mínima.

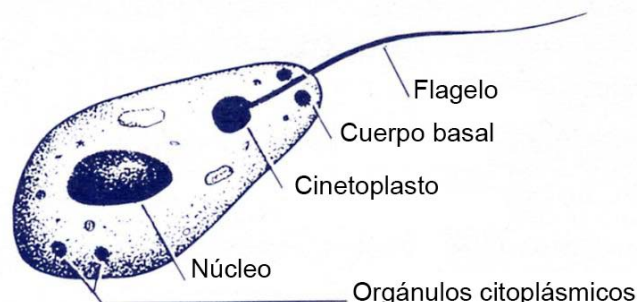
Sustancias que interfieren: No se utilizarán sueros que muestren grados elevados de hemólisis, ictericia, lipemia o crecimiento microbiano, pues en todas esas circunstancias se pueden producir resultados falsos. Si la muestra presenta partículas visibles, éstas deben ser eliminadas por centrifugado antes de la prueba.

Conservación: Los sueros se pueden conservar a 2-10 °C durante una semana como máximo. Si el análisis se posterga, los sueros deben conservarse congelados a una temperatura de -20°C o inferior. No se utilizarán refrigeradores ni congeladores con sistema "auto-frost" (eliminación automática de la escarcha).

PRECAUCIÓN: Si las muestras son sucesivamente congeladas y descongeladas, se pueden obtener resultados falsos positivos y negativos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para interpretar correctamente los resultados hay que reconocer claramente las diversas características morfológicas del microorganismo *Crithidia luciliae*.



La cubierta externa de la mayor parte de los protozoos consiste en una capa pelicular formada por lipoproteínas. En el interior de la película se encuentra la membrana plasmática. En ésta se incluye el citoplasma, formado por a) una capa de ectoplasma externo que contiene el cuerpo basal y el flagelo, y b) el endoplasma, un citoplasma interno muy líquido que contiene el núcleo, el cinetoplasto y otros orgánulos.

En general, se considera que la película, la membrana plasmática, el cuerpo basal y el flagelo son estructuras permanentes del interior del microorganismo, con escasa variabilidad en la localización de unas células a otras. Aunque por lo general el cinetoplasto se localiza más cerca del cuerpo basal que el núcleo, la localización exacta de este orgánulo puede variar de unas células a otras, debido a la naturaleza líquida del endoplasma.

Para distinguir claramente el cinetoplasto del núcleo hay que observar el pocillo de control positivo. El cinetoplasto siempre estará más cerca del flagelo (ilustración anterior). El cinetoplasto no se tiñe en el pocillo de control negativo, pero sí en el positivo.

SÓLO DEBE ANALIZAR UN MICROORGANISMO BIEN DEFINIDO POR CAMPO. LA MORFOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS PUEDE VARIAR DEBIDO A LA FIJACIÓN DURANTE LA FASE DE CRECIMIENTO LOGARÍTMICO.

CONTROL DE CALIDAD

Para el control de calidad se dispondrán los controles positivo, negativo y de PBS en los pocillos al efecto que se encuentran en todos los portaobjetos. El control positivo debe presentar una tinción de color azul-morado oscuro en el cinetoplasto de *Crithidia luciliae*, con o sin tinción del núcleo. El cinetoplasto no se tiñe en el control negativo. El control PBS se emplea para observar la tinción inespecífica del reactivo de anticuerpos, y no debe dar tinción azul. Si los controles no se ven como se ha descrito, la prueba no es válida y debe repetirse.

CONTROL TITULABLE OPCIONAL

Para interpretar los títulos, muchos laboratorio empiezan por el pocillo que contiene la muestra más diluida, y van "retrocediendo" hasta la dilución 1:10. El primer pocillo en el que se aprecie un patrón claramente discernible de tinción del cinetoplasto corresponde al título que se considera como criterio de valoración. Recomendamos utilizar esta técnica para determinar los criterios de valoración de los títulos.

El título medio y el rango de títulos (\pm una dilución doble a cada lado de la media) determinados para este número de lote han sido establecidos en nuestro laboratorio, y se consideran la norma. Este control se facilita para que cada laboratorio pueda evaluar la reproductibilidad (precisión) de sus análisis de anti-ADNn. Como quiera que este control no ha sido diseñado como indicador de la exactitud de la titulación, cada laboratorio deberá establecer su propio criterio de valoración del título medio para cada muestra, utilizando esta información para evaluar la reproductibilidad (precisión) de unos ciclos a otros.

Mediante la reiterada evaluación de este control titulable utilizando el sistema de análisis de ADNn Colorzyme® de Immuno Concepts, se ha establecido un título medio para cada número de lote. El número de lote, el título medio y el rango de títulos (\pm una dilución doble a cada lado de la media) figuran en la etiqueta del vial y deben servir como guía para el funcionamiento del sistema de análisis.

Puede que los valores obtenidos en nuestro laboratorio difieran de los suyos. He aquí algunos de los muchos factores que pueden afectar a sus resultados:

1. Correcta alineación del haz de luz del microscopio. Consulte las instrucciones del manual del microscopio.
2. La apertura numérica del objetivo. La apertura numérica está relacionada con la capacidad de absorción de luz y con la resolución del objetivo. La apertura numérica va impresa a un lado del objetivo.
3. Precisión y exactitud de la técnica de dilución, del equipo y de la realización de los procedimientos de análisis.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PACIENTE

Para ver *Crithidia* se recomienda un aumento total de 400X.

Negativos: Se considera que un suero es negativo para los anticuerpos anti-ADNn si la tinción del cinetoplasto es igual o inferior a la del pocillo de control negativo. La tinción del núcleo sin tinción del cinetoplasto también se considera negativa para los anticuerpos anti-ADNn.

Positivos: Se considera que un suero es positivo si el cinetoplasto se tiñe de forma discernible con una intensidad superior a la del pocillo de control negativo.

Títulos: Para interpretar los títulos, muchos laboratorio empiezan por el pocillo que contiene la muestra más diluida, y van “retrocediendo” hasta la dilución 1:10. El primer pocillo en el que se aprecie un patrón claramente discernible de tinción del cinetoplasto corresponde al título que se considera como criterio de valoración. Recomendamos utilizar esta técnica para determinar los criterios de valoración de los títulos.

INTENSIDAD DE LA TINCIÓN ENZIMÁTICA

No se ha observado que la intensidad de la tinción tenga un valor clínico; sólo tiene un valor limitado como indicador del título (32). Para simplificar la interpretación, anote los resultados de la selección que sean muy positivos o muy negativos, y efectúe la titulación en consecuencia.

Reacción muy positiva: Tinción de color azul-morado oscuro a muy oscuro con una clara definición del cinetoplasto.

Reacción positiva: Tinción de color azul-morado apagado o suave con mayor variabilidad de la tinción entre microorganismos. El perfil celular puede estar menos definido en algunos microorganismos, aunque la mayor parte mostrará una tinción claramente discernible del cinetoplasto.

NOTIFICACIÓN DE RESULTADOS

Selección: Se indicará si el resultado es muy positivo, positivo o negativo a la dilución 1:10.

Titulación: El resultado que se notifica es el de la última dilución en la que se observa una tinción claramente discernible del cinetoplasto. Si se obtiene una reacción intensa con la dilución 1:640 se notificará como igual o superior a 1:640.

CARACTERÍSTICAS DE TINCIÓN

Cinetoplasto: Tinción suave o periférica del cinetoplasto, cerca de la región flagelar del microorganismo.

Resultado: Positivo para anticuerpos anti-ADNn.

Antígenos: ADNn.

Asociación a enfermedades: Los títulos elevados sugieren LES activo (20) o, en caso de LES diagnosticado anteriormente, recurrencia o ausencia de respuesta al tratamiento (21-23).

Núcleo: Tinción suave, periférica o moteada del núcleo.

Resultado: Negativo para anticuerpos anti-ADNn.

Antígenos: Antígenos asociados al núcleo (21-23).

Asociación a enfermedades: La tinción nuclear positiva no se asocia a ninguna enfermedad del tejido conjuntivo concreta.

NOTA: Normalmente los resultados ANA positivos obtenidos con HEp-2 u otros sustratos no producen la tinción nuclear correspondiente en *C. luciliae*, p. ej., un ANA moteado con HEp-2 no muestra tinción nuclear moteada en *C. luciliae*.

Cuerpos basales: Tinción lisa de las dos esferas localizadas donde el flagelo se une al microorganismo en el ectoplasma.

Sinónimos: Pies basales.

Resultados: Negativo para anticuerpos anti-ADNn.

Antígenos: Antígenos asociados al cuerpo basal.

Asociación a enfermedades: Se ha notificado en pacientes con LES en quienes no se tiñe el cinetoplasto ni el núcleo (33).

Flagelo: Tinción del flagelo del microorganismo.

Sinónimos: Región de la cola del microorganismo.

Resultado: Negativo para anticuerpos anti-ADNn.

Antígenos: Antígenos desconocidos asociados al flagelo.

Asociación a enfermedades: Desconocida.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. No es posible hacer un diagnóstico basándose sólo en la detección de anticuerpos anti-ADNn. El médico debe interpretar estos resultados en el contexto de la historia y los síntomas del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos diagnósticos.
2. No se debe iniciar un tratamiento basándose exclusivamente en un resultado positivo del análisis de anticuerpos anti-ADNn. Antes de iniciar un tratamiento hay que tener en cuenta las indicaciones clínicas, otros hallazgos de laboratorio y la impresión clínica del médico.
3. Determinados fármacos, como procainamida e hidralazina, pueden inducir un trastorno similar al lupus eritematoso. Los pacientes con LE inducido por fármacos pueden presentar ANA positivos dirigidos habitualmente contra las histonas nucleares, aunque no se han notificado anticuerpos anti-ADNn (34-35).
4. Aunque una titulación elevada de anti-ADNn puede ser muy sugerente de LES, no debe considerarse diagnóstica, sino parte de la historia clínica general de un paciente. Es frecuente encontrar títulos bajos de anticuerpos anti-ADNn en sueros de pacientes con artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica progresiva, dermatomiositis, lupus eritematoso discoide y enfermedades mixtas de tejido conjuntivo (21).
5. Los pacientes en tratamiento con esteroides pueden dar resultados negativos para los anticuerpos anti-ADNn (36).

VALORES ESPERADOS

El valor previsto en la población normal es negativo a la dilución 1:10 utilizada para la selección. Determinados fármacos, como hidralacina, pueden inducir la producción de anticuerpos ADNn (34-35).

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

DETECCIÓN

Se evaluó la equivalencia del sistema de análisis de anticuerpos anti-ADNn Colorzyme® de Immuno Concepts con el sistema de análisis de ADNn por inmunofluorescencia indirecta de Immuno Concepts, mediante la selección y titulación de cuarenta y nueve muestras de suero representativas de la diversidad de autoanticuerpos que se observan en las enfermedades reumáticas sistémicas. Los resultados se correlacionaron al 100% en todos los sueros evaluados (37).

Se ha comparado el sistema de análisis de anticuerpos anti-ADNn por inmunofluorescencia de Immuno Concepts con otros dos sistemas de detección de anticuerpos por inmunofluorescencia comercializados (37). En el estudio se utilizaron 103 muestras de suero de individuos normales y de otros diagnosticados de lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC), esclerosis sistémica progresiva de Raynaud-variente CREST (ESP-CREST), artritis reumatoide (AR), artritis reumatoide juvenil (ARJ) y otras enfermedades del tejido conjuntivo. Los sueros fueron evaluados a las diluciones de selección recomendadas por cada fabricante. En la tabla 1 se resumen los resultados del estudio:

TABLA 1

DIAGNÓSTICO	Número de pacientes	Immuno Concepts Positivos 1:10	Fabricante A Positivos 1:10	Fabricante B Positivos 1:10
LES	30	13	13	11
EMTC/superposición	6	0	0	0
ESP de Raynaud-CREST	17	0	0	0
AR	2	0	0	0
ARJ	4	0	0	0
Otras enfermedades del tejido conjuntivo	9	0	0	0
Controles hospitalizados	11	1	1	1
Controles normales	24	0	0	0

El control hospitalizado que dio positivo en todos los análisis del ADNn de *Crithidia luciliae* padecía enfermedad renal por inmunocomplejos que no cumplía los criterios para el diagnóstico de LES.

PRECISIÓN

Se titularon por duplicado diez sueros positivos para ADNn en tres ocasiones. En todos los casos se reprodujeron los títulos, dentro del intervalo de más/menos una dilución doble (37). Estos resultados son compatibles con las normas de

precisión para los reactivos de anticuerpos fluorescentes establecidas por los Centers for Disease Control en Atlanta, Georgia.

BIBLIOGRAFICI

1. Robbins, W. C., Holman, H. R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. *California Medicine* 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: *The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D.* Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. *J. Immunol.* 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Hum. Pathol.* 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. *Semin. Arthritis Rheum.* 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. *J. Invest. Dermatol.* 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *J. Biol. Chem.* 254:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
14. Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52:148-159, 1972.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, C. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073, 1975.
17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration by Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 19:711-719, 1976.
20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
21. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Int. Med.* 83:464-469, 1975.
22. Stingl, G., Meingassner, J. G., Swelty, P., et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and of Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 6:131-140, 1976.
23. Edmonds, J. P., Johnson, G. D., Ansell, B.M., et al. The Value of Tests for Antibodies to DNA in Monitoring the Clinical Course of Systemic Lupus Erythematosus. A Long Term Study Using the Farr Test and the DNA Counterimmunoelectrophoretic Method. *Clin. Exp. Immunol.* 22:9-15, 1975.
24. Simpson, L. Behavior of the Kinetoplast of *Leishmania tarentolae* Upon Cell Rupture. *J. Protozool.* 15:132-136, 1968.
25. Aarden, L. A., DeGroot, E. R., Feltkamp, T.E.W. Immunology of DNA. III *Crithidia luciliae*, a Simple Substrate for the Determination of Anti-dsDNA with the Immunofluorescent Technique. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 254:505-515, 1975.
26. Laurent, M., van Assel, S., Steinert, M. Kinetoplast DNA. A Unique Macromolecular Structure of Considerable Size and Mechanical Resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:278-284, 1971.
27. Deegan, M. J., Walker, S. E., Lovell, S. E. Antibodies to Double Stranded DNA. A Comparison of the Indirect Immunofluorescent Test Using *Crithidia luciliae* and the DNA-Binding Assay. *Am. J. Clin. Pathol.* 69:599-604, 1978.
28. Feltkamp, T. E.W., van Rossum, A. L. Antibodies to Salivary Duct Cells, and Other Autoantibodies, in Patients with Sjögren's Syndrome and Other Idiopathic Autoimmune Diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 3:1-16, 1968.
29. Murakami, W. T., van Vunakis, H., Grossman, L., et al. Immunochemical Studies of Bacteriophage Deoxyribonucleic Acid. II. Characterization of the Active Antigen. *Virology* 14:190-197, 1961.
30. Locker, J. D., Medof, M. E., Bennett, R. M., et al. Characterization of DNA Used to Assay Sera for Anti-DNA Antibodies; Determination of the Specificities of Anti-DNA Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus and Non-SLE Rheumatic Disease States. *J. Immunol.* 118:694-701, 1977.
31. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A. Current Status of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA) in Systemic Rheumatic Diseases. In: *Immunoassays in the Clinical Laboratory.* Ed. by Nakamura, R. M., Dito, W. R., Tucker, E. S., pp. 317-338. Alan R. Liss, Inc., New York, NY. 1979.
32. Nakamura, R. M., Peebles, C. L., Molden, D. P.: et al. Advances in Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases, *Laboratory Med.* 15:190-198, 1984.
33. Vogel, J. C., Roberts, J. L., Lewis, E. J. A Non-Anti-DNA Antibody Detected With the *Crithidia luciliae* Anti-DNA Assay. *New Engl. J. Med.* 303:458-459, 1980.
34. Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. *J. Rheum.* 2:215-220, 1975.
35. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. *J. Rheum.* 2:167-171, 1975.
36. Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia luciliae* Method. *Arthritis Rheum.* 22:321-328, 1979.
37. Data on file. Immuno Concepts, Incorporated.

En caso de daños al envoltorio protector, póngase en contacto con Immuno Concepts antes de usar el producto.



Fabricante



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Limitación De la Temperatura



Contiene suficiente para <n> pruebas



Consulte las instrucciones de uso



Dispositivo Médico De diagnóstico In vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9779 Business Park Drive Sacramento, CA. 95827
Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
Email: techservice@immunoconcepts.com

Cat 5000-I,

4.11.02.003.094-Es

Rev 1.0 © Copyright 2007

PROCEDIMIENTO DE LA ANÁLISIS DE NDNA COLORZYME®

- 1. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN (PBS)**

Disuelva el contenido de una bolsa de tampón en un litro de agua desionizada o destilada. El tampón PBS se puede tapar y conservar a 2-10°C durante cuatro semanas como máximo.
- 2. PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE COLOR**

Disuelva el contenido de una bolsa en 150 ml de agua desionizada o destilada. Mezcle bien hasta que se disuelva por completo. Este reactivo de color es estable durante 30 días a temperatura ambiente en un envase cerrado. Puede ser reutilizado durante 30 días como máximo, o hasta que se aprecie un cambio de color o alguna precipitación. Es normal que al volverlo a utilizar presente turbidez u opalescencia, sin precipitado visible. Dependiendo de la frecuencia de utilización, se pueden utilizar 150 ml de reactivo de color Colorzyme® con un máximo de 20 portaobjetos.
- 3. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PACIENTE**

Selección: Disuelva las muestras de paciente a 1:10 añadiendo 0,1 ml (100 µl) de suero a 0,9 ml de PBS reconstituido.
Titulación semicuantitativa: Para preparar series de diluciones dobles de las muestras de selección (p. ej., 1:20, 1:40, 1:80...1:640), saque 0,5 ml de la dilución 1:10 y mézclelos con 0,5 ml de PBS para obtener una dilución 1:20, y así para las sucesivas diluciones.
- 4. DILUCIÓN DEL CONTROL TITULABLE OPCIONAL**

Considere que el control titulable opcional es una muestra de paciente no diluida. Diluya el control a 1:10 añadiendo 0,1 ml (100 µl) del suero de control a 0,9 ml de PBS preparado. Prepare diluciones dobles del control titulable como se ha descrito.
- 5. PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS CON SUSTRATO (20-25 µl/pocillo)**

Saque los portaobjetos de las bolsas y disponga los sueros de control en los pocillos de control, como se indica: Invierta el frasco cuentagotas de control y apriete hasta que se vea una gota en la punta. Toque suavemente el pocillo de control con la gota, evitando que la punta del cuentagotas entre en contacto directo con la superficie del portaobjetos. Añada una gota (20-25 µl) de muestra de paciente a los pocillos numerados.
PRECAUCIÓN: SI LA PUNTA DEL CUENTAGOTAS TOCA DIRECTAMENTE LA SUPERFICIE DEL PORTAOBJETOS, SE PUEDE DAÑAR EL SUSTRATO DE ANTÍGENO.
- 6. INCUBACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS (30 ± 5 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18 y 24°C)**

Ponga los portaobjetos en una cámara cubierta y húmeda (basta con una placa de Petri con una toalla de papel humedecida). Incube con la tapa puesta durante 30 minutos (± 5 minutos) a temperatura ambiente (18-24°C).
- 7. ENJUAGUE CON PBS**

Saque los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y aclárelos un poco con PBS utilizando una jeringa o una pipeta de Pasteur o serológica. No utilice la jeringa directamente sobre los pocillos.
NOTA: Para evitar la contaminación cruzada de los portaobjetos con 13 pocillos, dirija el chorro de PBS a la línea media del portaobjetos, inclinandolo primero hacia los pocillos 1-5 y luego hacia los pocillos 6-10.
- 8. LAVADO CON PBS (10 minutos)**

Lave los portaobjetos con PBS durante 10 minutos, en una placa de tinción de portaobjetos o en una jarra Coplin. Este lavado puede durar 10-30 minutos sin que varíen los resultados finales. Una vez utilizada, tire la solución de lavado PBS.
- 9. REACTIVO PARA DETECTAR ANTICUERPOS ENZIMÁTICOS (cubra los pocillos con 10-12 gotas)**

Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno y sumérgalos 3-5 veces en agua desionizada o destilada. Pase un papel secante o una toalla de papel por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante. Vuelva a colocar de inmediato el portaobjetos en la cámara de incubación y cubra los pocillos por completo con el reactivo enzimático para detectar anticuerpos; empiece por poner una gota en cada pocillo. Repita la operación en cada portaobjetos. El reactivo enzimático para detectar anticuerpos ha sido titulado para compensar el agua desionizada o destilada residual que queda en el portaobjetos tras el enjuague.
NOTA: Es importante que los pocillos del portaobjetos no se sequen durante este procedimiento, pues se podría dañar el sustrato. **NO MANCHE NI SEQUE EL PORTAOBJETOS NI DEJE QUE PASEN MÁS DE 15 SEGUNDOS SIN AÑADIR EL REACTIVO ENZIMÁTICO.**
- 10. INCUBACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS (30 ± 5 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18 y 24°C)**

Ponga la tapa de la cámara de incubación. Deje que los portaobjetos se incuben 30 minutos (± 5 minutos) a temperatura ambiente (18-24°C).
- 11. ENJUAGUE CON PBS**

Retire los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y enjuáguelos un poco con PBS. No utilice la jeringa directamente sobre los pocillos.
- 12. LAVADO CON PBS (10 minutos)**

Lave los portaobjetos con PBS durante 10 minutos, en una placa de tinción de portaobjetos o en una jarra Coplin. Este lavado puede durar 10-30 minutos sin que varíen los resultados finales.
- 13. INCUBACIÓN DEL REACTIVO DE COLOR (30 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18 y 24°C)**

Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno, sumérgalos 3-5 veces en agua desionizada o destilada y golpéelos suavemente por un lado con un papel secante o con toallas de papel, para retirar el exceso de agua. Coloque los portaobjetos inmediatamente en una jarra Coplin con reactivo de color activado, y deje incubar durante 30 minutos.)
- 14. ENJUAGUE CON PBS**

Saque los portaobjetos de uno en uno de la jarra de Coplin y enjuague con PBS por los dos lados durante 4-5 segundos. No utilice la jeringa directamente sobre los pocillos. Ponga cada portaobjetos enjuagado con PBS en una jarra Coplin llena de agua destilada o desionizada, hasta que el reactivo de color desaparezca de todos los portaobjetos. Pase inmediatamente al paso 15.
- 15. PREPARACIÓN DE LOS CUBREOBJETOS**

Saque los portaobjetos de uno en uno del agua desionizada o destilada y golpéelos suavemente por un lado con un papel secante o con toallas de papel, para retirar el exceso de agua.
NO SEQUE EL PORTAOBJETOS NI DEJE QUE PASEN MÁS DE 15 SEGUNDOS SIN PONER EL CUBREOBJETOS. Añada 4-5 gotas de medio de preparación semipermanente en la línea media de cada portaobjetos. Coloque el cubreobjetos con cuidado, evitando que se formen bolsas de aire, haciendo bajar suavemente el cubreobjetos de un lado del portaobjetos al otro.
NOTA: Si pone demasiado medio de preparación en el portaobjetos puede que la resolución de las células no sea clara (imagen borrosa). Si ha puesto demasiado medio de preparación, puede retirarlo del portaobjetos secando suavemente el cubreobjetos con papel secante o para lentes, evitando cualquier movimiento directo del cubreobjetos. Los portaobjetos se pueden interpretar de inmediato, o conservarlos durante algún tiempo a 2-10°C sin que se pierda la reactividad.

ASISTENCIA TÉCNICA: +1-916-363-2649
o correo electrónico: techservice@immunoconcepts.com