



Fluorescent nDNA Test System

For Professional Use
Pour l'Usage Professionnel
Per Uso Professionale
Para El Uso Profesional
Für Professionellen Gebrauch
För yrkesmässigt bruk

English 2

Français 5

Italiano 11

Español 16

Deutsch 21

Svensk 26

Bibliography 31

Bibliographie/Riferimenti
Bibliografici/Bibliographie/Bibliografi

FLUORESCENT NDNA TEST SYSTEM FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

INTENDED USE: This is an indirect fluorescent antibody test for the semi-quantitative detection of anti-nDNA antibody in human serum. This test system is to be used as an aid in the diagnosis of systemic lupus erythematosus.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Antinuclear antibody (ANA) is a general term used to describe autoantibodies against various cell nuclear proteins. Early studies of these autoantibodies, using immunofluorescent techniques, revealed a select few nuclear protein specificities (1). Because of the high correlation of positive ANA with systemic lupus erythematosus (SLE), a negative ANA essentially ruled out the disease (2).

Although antibodies specific to DNA continue to show a high disease correlation with SLE (3), in recent years a number of nuclear (4) and cytoplasmic (5-7) macromolecules have been detected and associated with other connective tissue diseases (8-10). Because a number of these antibodies appear to be of diagnostic and/or prognostic use in progressive systemic sclerosis (11-12), mixed connective tissue disease (13-15), Sjögren's syndrome (16-17), polymyositis (18), and rheumatoid arthritis (19), ANA testing is now recognized as a general screening tool for connective tissue disease (20).

SLE patients may produce antibodies to a variety of nuclear antigens, but antibodies directed against Sm (Smith antigen) and nDNA show the highest correlation with disease (20). Antibodies directed against Sm demonstrate a speckled ANA staining pattern while antibodies directed against nDNA generally demonstrate a homogeneous ANA staining pattern. Although low levels of nDNA antibodies may be present in the serum of patients with rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, progressive systemic sclerosis, dermatomyositis, discoid lupus erythematosus, and mixed connective tissue disease (21), high levels of nDNA antibodies are seen almost exclusively in SLE. Antibodies against nDNA are thought to be involved in the pathogenesis of the most severe variants of SLE when deposited as immune complexes (22). Antibodies to nDNA occur in high titer, and, because they correlate with disease activity (23), their detection is important in the management of SLE patients.

Several assays are available for the detection of nDNA antibodies. The most commonly used methods include indirect immunofluorescence, radioimmunoassay, counterimmunoelectrophoresis, and immunodiffusion (24-27). The Immuno Concepts nDNA test system is an indirect fluorescent antibody (IFA) method. Serum antibody, reactive to nDNA, is detected by staining of the kinetoplast within the organism *Crithidia lucilliae* (34). *C. lucilliae* is a parasite of the blowfly and is non-pathogenic to humans. The kinetoplast of these hemoflagellates is part of the large mitochondrion in which the helical nDNA is concentrated (33-34). In electron micrographs, the kinetoplast appears as a slightly concave, disc-shaped structure containing mitochondrial cristae and a fibrous DNA mass (35). The kinetoplast is found between the centrally located nucleus and the basal body of the flagellum. Because the kinetoplast nDNA contains no single-stranded DNA (ssDNA) contaminants, potential problems of ssDNA false-positive reactions, which may occur with calf thymus DNA radioimmunoassay, are virtually eliminated (28-33).

PRINCIPLE OF THE TEST

The IC nDNA test uses the indirect fluorescent antibody technique first described by Weller and Coons (36). Patient samples are incubated with antigen substrate to allow specific binding of autoantibodies to kinetoplast nDNA. If nDNA antibodies are present, a stable antigen-antibody complex is formed. After washing to remove non-specific antibodies, the substrate is incubated with an anti-human antibody reagent conjugated to fluorescein. When results are positive, there is the formation of a stable three-part complex consisting of fluorescent antibody bound to human anti-nDNA antibody which is bound to nDNA antigen. This complex can be visualized with the aid of a fluorescent microscope. In positive samples, the kinetoplast or the kinetoplast and nucleus will show a bright apple green fluorescence within the *Crithidia lucilliae* organisms. If the sample is negative for nDNA, the kinetoplast will show no fluorescence.

SYSTEM COMPONENTS (MATERIALS PROVIDED)

Use: All components come ready to use with no

aliquoting or reconstitution required (except the PBS buffer which must be dissolved in deionized or distilled water before use).

Storage: All components can be stored under refrigeration at 2-10°C. After reconstitution, PBS buffer should be stored in screw cap containers under refrigeration at 2-10°C.

Stability: All components remain stable at least 12 months from date of manufacture. Do not use any component beyond its expiration date.

REACTIVE REAGENTS

Substrate Slides: *Catalog No. 3007 (seven-well); 3013 (thirteen-well). Seven or thirteen well nDNA substrate slides using *Crithidia lucilliae* stabilized directly on the test wells. Unique moat slide design minimizes cross contamination of wells during testing. Slides include control wells designated positive, negative, and PBS to aid in proper interpretation of results.

Positive Control: Catalog No. 3021. Ready-to-use dropper vial containing 1.0 ml positive human control serum with antibody specific to nDNA antigens. This serum demonstrates a bright positive staining reaction on the kinetoplast on IC's *Crithidia lucilliae* substrate. This reagent contains 0.1% sodium azide as a preservative.

Titratable Control Serum: Catalog No. 3026. Ready-to-use vial containing 1.0 ml positive human control serum to be treated as an undiluted patient sample. This reagent contains 0.1% sodium azide as a preservative. See vial label for titer value.

Negative Control Serum: Catalog No. 3031. Ready-to-use dropper vial containing 1.0 ml negative human control serum. The negative control serum will not show any specific staining of the kinetoplast on IC's *Crithidia lucilliae* substrate. This reagent contains 0.1% sodium azide as a preservative.

Fluorescent Antibody Reagent: Catalog No. 3009 (9.0 ml), 3075 (23 ml). Goat anti-human IgG (heavy and light chains) conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC). Reagent comes ready-to-use in precision dropper bottles with 9.0 ml for each 10 slides in complete test kits. This reagent contains 0.1% sodium azide as a preservative.

**This slide is protected by one or more of the following U.S. and foreign patents: 4387979; D-274261; D-273261; Canadian patent 1171302 and other patents pending.*

NON-REACTIVE REAGENTS

PBS Buffer Powder: Catalog No. 1011. Phosphate-buffered saline powder (0.01 M, pH 7.4 ± 0.2). Each pouch contains sufficient buffer powder to make 1 liter. (One pouch of buffer powder is supplied for each five slides in complete test kits.)

Preparation: Dissolve one pouch of buffer powder in 1 liter of deionized or distilled water, cover, and store refrigerated at 2-10°C for up to four weeks or until signs of contamination or other visible changes occur.

Semi-Permanent Mounting Medium: Catalog No. 1111. Ready-to-use dropper vial containing 5.0 ml glycerol-based mounting medium, pH 9.1 ± 0.2. This reagent contains 0.1% sodium azide as a preservative.

Coverslips: Catalog No. 1041. Each packet contains ten 24x60 mm No. 1 glass coverslips.

ADDITIONAL MATERIALS REQUIRED (BUT NOT PROVIDED)

- Volumetric pipettes to deliver 20-25 µl volumes
- Coplin jars or staining dishes
- Squeeze bottle or Pasteur pipettes
- Serological pipettes
- Deionized or distilled water
- Test tubes to prepare serum dilutions
- Bibulous paper or paper towels
- Disposable latex gloves
- One-liter screw cap containers (for PBS buffer)
- Lab timer
- Fluorescent microscope equipped with 495 nm exciter filter and 515 nm barrier filter.

PRECAUTIONS

- All human source material used in the preparation of controls for this product has been tested and found to be negative (not repeatedly reactive) for

antibody to human immunodeficiency virus-1 and human immunodeficiency virus-2 (HIV-1 & HIV-2), antibody to hepatitis C virus (HCV), and for hepatitis B surface antigen (HBsAg) by an FDA approved method. No test method can offer complete assurance that HIV-1, HIV-2, hepatitis C virus, hepatitis B virus, or other infectious agents are absent. Thus, all control sera should be handled in the same manner as potentially infectious materials.

- All patient samples should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1984 Edition.
- Dilution of the components or substitution of components other than those provided in this system may yield inconsistent results.
- Sodium azide (0.1%) is used as a preservative. Sodium azide may react with lead or copper plumbing and form explosive metal azide salts. When disposing of reagents, flush with ample volumes of tap water to prevent potential residues in plumbing. Sodium azide is a poison and may be toxic if ingested.
- This kit is for *in vitro* diagnostic use.
- In the event hemolyzed or lipemic sera must be used, heat inactivate sera 30 minutes at 56°C for optimal results. Microbially contaminated sera should not be used.
- The titratable control serum is intended for use in monitoring lot to lot and run to run reproducibility. It is not intended as a measurement of overall sensitivity or specificity of the assay.
- Do not smoke, eat, or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Avoid splashing or generation of aerosols at all times.
- Incubation times and temperatures other than those specified may give false results.
- Cross contamination of reagents or samples may give false results.
- Reusable glassware must be washed and thoroughly rinsed free of detergents prior to use. All glassware must be clean and dry before use.
- Bring all reagents, slides, and specimens to room temperature (18-24°C) prior to use.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents, and wash hands thoroughly afterwards.
- Microbial contamination of reagents or samples may give false results.
- Never pipette by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes. If contact occurs, wash with a germicidal soap and copious amounts of water.

SPECIMEN COLLECTION

Collection: Serum is the preferred specimen. Approximately 5 ml of whole blood should be collected aseptically by venipuncture using a sterile vacuum collection tube or other suitable collection system. Allow blood to clot at room temperature (18-24°C). Serum should be separated from the clot by centrifugation as soon as possible to minimize hemolysis.

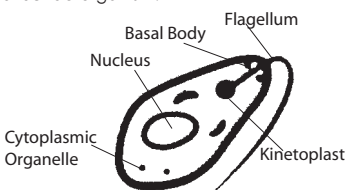
Interfering Substances: Sera exhibiting a high degree of hemolysis, icterus, lipemia, or microbial growth should not be used because these conditions may cause false results. Specimens containing visible particulate matter should be clarified by centrifugation before testing.

Storage: Sera may be stored at 2-10°C up to one week. If testing is further delayed, sera should be stored frozen at -20°C or lower. Serum should not be stored in a self-defrosting refrigerator or freezer.

CAUTION: Repeated freeze/thawing of patient samples may yield false positive or false negative results.

INTERPRETATION OF RESULTS

Proper interpretation of results depends on clear recognition of the various morphologic features of the *Criethidia luciliae* organism.



The outer covering on most protozoa consists of a pellicle layer composed of lipoprotein. Inside the pellicle lies the plasma membrane. The plasma

membrane encloses the cytoplasm consisting of a) an outer ectoplasm layer containing the basal body and flagellum and b) the endoplasm, a very fluid inner cytoplasm containing the nucleus, kinetoplast, and other organelles.

The pellicle, plasma membrane, basal body, and flagellum are generally considered permanent fixtures within the organism with little variability in location from cell to cell. Although the kinetoplast is generally located closer to the basal body than the nucleus, the exact location of this organelle may vary from cell to cell due to the fluid nature of the endoplasm.

In order to clearly differentiate the kinetoplast from the nucleus, view the positive control well. The kinetoplast will always be located nearer the flagellum (illustrated above). The negative control well will show no kinetoplast staining while the positive control will show kinetoplast staining.

READ ONLY SINGLE, WELL-DEFINED ORGANISMS WITHIN EACH FIELD. MORPHOLOGY MAY VARY FROM ORGANISM TO ORGANISM DUE TO FIXATION DURING LOG PHASE GROWTH.

QUALITY CONTROL

Positive, negative, and PBS controls should be run in the wells provided for quality control on each slide. The positive control should show bright apple-green fluorescence in the kinetoplast of the *Criethidia luciliae*, with or without staining of the nucleus. The negative control will show no staining of the kinetoplast. The PBS control is used to observe non-specific staining by the antibody reagent, and should not exhibit any green fluorescence. If the controls do not appear as described, the test is invalid and should be repeated.

OPTIONAL TITRATABLE CONTROL

When reading titers, many laboratories begin reading with the well that contains the most dilute sample and read "backwards" to the 1:10 dilution. The first well in which clearly discernible kinetoplast staining is visible is the titer end-point. We recommend this technique for determining titer end-points.

The mean titer and titer range (\pm one dilution on either side of the mean) determined for this lot number were established in our laboratory and are stated as a guide. This control is provided to allow each laboratory to assess the reproducibility (precision) of its nDNA testing. Since this control is not intended to be an indicator of titer accuracy, each laboratory should establish its own mean titer end-point for this sample, and should use this information to assess run-to-run reproducibility (precision).

Through multiple testing of this titratable control, using the Immuno Concepts Fluorescent nDNA Test System, a mean titer value has been established for each lot number. The lot number, mean titer and titer range (\pm one twofold dilution on either side of the mean) are stated on the vial label and should be used as a guide for the test system performance.

The values obtained in our laboratory may differ from your values. Some of the many factors that can affect your results may include, but are not limited to:

- The type of light source used. Mercury light sources will produce greater excitation energy at 495 nm than Quartz/Halogen. The 50-watt, 100-watt, and 200-watt Mercury light sources differ little in excitation energy at 495 nm. The 100-watt Quartz/Halogen light sources will produce greater excitation energy at 495 nm than 50-watt Quartz/Halogen.
- The condition and age of the light source. This is particularly true for Mercury light sources which generally exhibit a gradual reduction in excitation energy at 495 nm prior to burning out. This gradual reduction in excitation energy can result in a significant loss in sensitivity over several weeks. This problem can be avoided by keeping a time log. For best results, replace 50-watt mercury bulbs at 100 hours, and 100 or 200-watt mercury bulbs at 200 hours. Quartz/Halogen light sources generally do not exhibit a gradual reduction in excitation energy prior to burning out.
- The type of exciter filter used. Interference exciter filters provide greater sensitivity over a much narrower wavelength than absorption exciter filters. Refer to your fluorescent micro-scope manual or sales representative for more information.
- Proper alignment of the microscope light path. Refer to your fluorescent microscope manual for

instructions.

- The numerical aperture of the objective. With incident light fluorescence (Epi), fluorescence is increased exponentially as the numerical aperture (NA) of the objective is increased additively. This may cause a 40X objective with a NA of 0.65 to read one or more dilutions lower than a 40X objective with a NA of 0.85. The numerical aperture is printed on the side of the objective.
- Suppression filters. Suppression filters reduce specific wavelengths of excitation and may be used in reducing sensitivity. Refer to your fluorescent microscope manual or sales representative for more information.
- Precision and accuracy of dilution technique, equipment, and performance of the test procedures.

INTERPRETATION OF PATIENT RESULTS

400X total magnification is recommended for viewing the *Crithidia*.

Negative: A serum is considered negative for antibodies to nDNA if kinetoplast fluorescence is less than or equal to the negative control well. Nuclear staining, without kinetoplast staining, is also considered negative for antibodies to nDNA.

Positive: A serum is considered positive if the kinetoplast shows clearly discernible staining with fluorescence greater than the negative control well.

Titers: When reading titers, many laboratories begin reading with the well that contains the most dilute sample and read "backwards" to the 1:10 dilution. The first well in which clearly discernible staining of the kinetoplast is visible is the titer end-point. We recommend this technique for determining titer end-points.

FLUORESCENT INTENSITY

Fluorescent intensity may be semi-quantitated by following the guidelines for fluorescent antibody reagents established by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia (CDC).

- 4+ Brilliant yellow-green (maximal fluorescence)
- 3+ Less brilliant yellow-green fluorescence
- 2+ Definite cell pattern but dim fluorescence
- 1+ Very subdued fluorescence

A standard slide for the determination of these fluorescent intensities, FITC QC Slide™, catalog number 1900, is available from Immuno Concepts N.A., Ltd.

REPORTING OF RESULTS

Screening: Results should be reported as positive or negative at the 1:10 dilution.

Titring: Results should be reported as the last serial dilution in which clearly discernible staining of the kinetoplast is seen. Results with a strong reaction at the 1:640 dilution should be reported as greater than 1:640.

STAINING CHARACTERISTICS

Kinetoplast: A smooth or peripheral staining of the kinetoplast located near the flagellar region of the organism.

Result: Positive for antibodies to nDNA.

Antigens: nDNA.

Disease Association: High titers suggestive of active SLE (20) or in the case of previously diagnosed SLE, recurrent disease, or lack of response to therapy (21-23).

Nucleus: A smooth, peripheral, or speckled staining of

the nucleus.

Result: Negative for antibodies to nDNA.

Antigens: Nuclear associated antigens (21-23).

Disease Association: Non specific connective tissue disease may be indicated by the positive nuclear staining.

NOTE: Positive ANA results by HEp-2 or other substrates do not normally give the corresponding nuclear staining on *C. luciliae*, e.g. a speckled ANA by HEp-2 does not demonstrate speckled nuclear staining on *C. luciliae*.

Basal Bodies: A smooth staining of two spheres located where the body of the organism attaches to the flagellum in the ectoplasm.

Synonyms: Basal feet.

Results: Negative for antibodies to nDNA.

Antigens: Basal body associated antigens.

Disease Association: Reported in SLE patients not exhibiting kinetoplast or nucleus staining (37).

Flagellum: Staining of the flagellum of the organism.

Synonyms: Tail region of the organism.

Results: Negative for antibodies to nDNA.

Antigens: Unknown flagella-associated antigens.

Disease association: Unknown.

LIMITATIONS OF THE TEST

- Diagnosis cannot be made on the basis of anti nDNA antibody detection alone. The physician must interpret these results in conjunction with the patient's history and symptoms, the physical findings, and other diagnostic procedures.
- Treatment should not be initiated on the sole basis of a positive test for anti nDNA antibodies. Clinical indications, other laboratory findings, and the physician's clinical impression must be considered before any treatment is initiated.
- Certain drugs, including procainamide and hydralazine, may induce a lupus erythematosus-like disease. Patients with drug-induced LE may demonstrate positive ANAs commonly directed against nuclear histones, although antibody to nDNA has also been reported (38-39).
- Although a high-titered nDNA may be highly suggestive of SLE, it should not be considered diagnostic but rather viewed as a part of the overall clinical history of a patient. Low titers of nDNA antibodies are often present in the sera of patients with rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, progressive systemic sclerosis, dermatomyositis, discoid lupus erythematosus, and mixed connective tissue disease (21).
- Because of the many options available in fluorescent microscopes, it is recommended that light sources, filters, and optics be standardized when comparing patient titers between laboratories.
- Patients undergoing steroid therapy may have negative results for nDNA antibody (40).

EXPECTED VALUES

The expected value in the normal population is negative at a 1:10 screening dilution. Certain drugs, such as hydralazine, may induce nDNA antibody production (38-39).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The Immuno Concepts nDNA test system was evaluated in comparison with two other fluorescent antibody tests in commercial distribution (41). The study employed 103 serum samples from normal individuals as well as from patients with diagnoses including systemic lupus erythematosus (SLE), mixed connective tissue disease (MCTD), Raynaud's-progressive systemic sclerosis-CREST variant (PSS-CREST), rheumatoid arthritis (RA), juvenile rheumatoid arthritis (JRA), as well as other connective tissue disease. Sera were tested at the recommended screening dilutions for each manufacturer. Study results are summarized in table 1.

TABLE 1

Diagnosis	Number of patients	Immuno Concepts Positive 1:10	Manufacturer A Positive 1:10	Manufacturer B Positive 1:10
SLE	30	13	13	11
MCTD / Overlap	6	0	0	0
Raynaud PSS-CREST	17	0	0	0
RA	2	0	0	0
JRA	4	0	0	0
Other connective tissue disease	9	0	0	0
Hospital controls	11	1	1	1
Normal controls	24	0	0	0

The hospitalized control who was positive on all *Crithidia luciliae* nDNA tests had immune complex renal disease which did not meet criteria for diagnosis of SLE.

FLUORESCENT nDNA TEST PROCEDURE

- 1. RECONSTITUTE BUFFER (PBS)**

Dissolve contents of one buffer pouch in one liter of deionized or distilled water. The PBS buffer may be covered and stored at 2-10°C up to four weeks.
- 2. DILUTE PATIENT SAMPLES**

Screening: Dilute patient samples to 1:10 by adding 0.1 ml (100 µl) serum to 0.9 ml reconstituted PBS.
Semi-Quantitative Titering: To make two-fold serial dilutions of screening samples (e.g. 1:20, 1:40, 1:80...1:640), remove 0.5 ml of the 1:10 dilution and mix with 0.5 ml of PBS to achieve a 1:20 dilution, and continue serial dilutions in this fashion.
- 3. DILUTE OPTIONAL TITRATABLE CONTROL**

Treat the optional titratable control as an undiluted patient sample. Dilute the control 1:10 by adding 0.1 ml (100 µl) of the control serum to 0.9 ml of reconstituted PBS. Make two-fold serial dilutions of the titratable control as outlined above.
- 4. PREPARE SUBSTRATE SLIDES (20-25 µl/well)**

Remove slide(s) from pouch(es) and place control sera on control wells as follows: Invert control dropper bottle and squeeze gently until drop is visible at the tip. Gently touch the drop to appropriate control well while avoiding direct contact of dropper tip with slide surface. Place positive control on well marked "+", negative control on well marked "-", and one drop of PBS buffer on well marked "PBS". Add 1 drop (20-25 µl) patient sample to the numbered wells. CAUTION: DIRECT CONTACT OF DROPPER TIP WITH SLIDE SURFACE MAY RESULT IN DAMAGE TO THE ANTIGEN SUBSTRATE.
- 5. INCUBATE SLIDES (30±5 minutes at room temperature, i.e. 18-24°C)**

Place slide(s) into a moist covered chamber (a petri dish with moistened paper toweling will be adequate). Incubate, with lid in place, for 30 minutes (±5 minutes) at room temperature (18-24°C).
- 6. PBS RINSE**

Remove slide(s) from incubator tray and rinse briefly with PBS using a squirt bottle, Pasteur, or serological pipette. Do not squirt buffer directly on the wells.
NOTE: To avoid cross contamination on 13-well slides, direct PBS stream along midline of slide, tilting first toward wells 1-5 followed by tilting toward wells 6-10.
- 7. PBS WASH (10 minutes)**

Wash slide(s) 10 minutes with PBS in a slide staining dish or Coplin jar. Gentle agitation is recommended at slide immersion, midpoint, and removal. This wash may be extended 10-30 minutes with no variability in final test results. Discard PBS wash solution after use. For optimal results, change PBS at midpoint and use a magnetic stirrer.
- 8. FLUORESCENT ANTIBODY REAGENT (Cover the wells with 10-12 drops)**

Remove one slide at a time from PBS and dip 3-5 times in deionized or distilled water. Tap slide on its side against bibulous paper or paper toweling to remove excess water. Immediately return slide to the incubation chamber and cover the wells completely using fluorescent antibody reagent; begin by placing a drop over each well. Repeat for each slide. Fluorescent antibody reagent has been titered to compensate for residual deionized or distilled water remaining on the slide after rinsing.
NOTE: It is important that slide wells do not dry during this procedure or damage to the substrate may occur.
DO NOT BLOT OR DRY THE SLIDE IN ANY MANNER OR ALLOW SLIDE TO SIT WITHOUT FLUORESCENT ANTIBODY REAGENT FOR LONGER THAN 15 SECONDS.
- 9. INCUBATE SLIDES (30±5 minutes at room temperature, i.e. 18-24°C)**

Place lid on incubation chamber and cover with a paper towel to prevent exposure to light if the chamber is not opaque. Allow slide(s) to incubate 30 minutes (±5 minutes) at room temperature (18-24°C).
- 10. PBS RINSE**

Remove slide(s) from incubator tray and rinse briefly with PBS. Do not squirt buffer directly on the wells.
- 11. PBS WASH (10 minutes)**

Wash slide(s) 10 minutes with PBS in a slide staining dish or Coplin jar. Gentle agitation is recommended at slide immersion, midpoint, and removal. This wash may be extended 10-30 minutes with no variability in final test results.
- 12. MOUNT COVERSLIP**

Remove one slide at a time from PBS and dip 3-5 times in deionized or distilled water. Tap slide on its side against bibulous paper or paper toweling to remove excess water. DO NOT BLOT OR DRY THE SLIDE IN ANY MANNER OR ALLOW TO SIT WITHOUT COVERSLIP FOR LONGER THAN 15 SECONDS. Add 4-5 drops of semi-permanent mounting medium along midline of each slide. Carefully place coverslip in position, avoiding air pockets, by gently lowering coverslip from one end of the slide to the other.
NOTE: Excess mounting medium on slide may result in high background fluorescence, due to light scattering, or lack of clear resolution of cells (blurred image). Excess mounting medium may be removed from slide by gently blotting coverslip with bibulous or lens paper while avoiding any direct movement of the coverslip.

For Technical Assistance:
1-800-251-5115 (Toll Free) or e-mail:
techservice@immunoconcepts.com

SYSTÈME DE TEST ADN natif FLUORESCENT POUR UTILISATION DIAGNOSTIQUE IN VITRO

UTILISATION PRÉVUE : Il s'agit d'un test d'immunofluorescence indirecte pour la détection semi-quantitative des anticorps anti-ADN natif dans le sérum humain. Ce système de test doit être utilisé comme une aide au diagnostic du lupus érythémateux disséminé.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Anticorps anti-nucléaire (ANA) est un terme général utilisé pour décrire les auto-anticorps dirigés contre diverses protéines nucléaires. Les premières études portant sur ces auto-anticorps, à l'aide de techniques d'immunofluorescence, ont révélé quelques spécificités des protéines nucléaires (1). La corrélation entre la positivité des tests ANA et le lupus érythémateux disséminé (LED) étant très élevée, un test ANA négatif exclut, de fait, cette maladie (2).

Bien que la présence d'anticorps anti-ADN constitue toujours une forte présomption de LED (3), un certain nombre de macromolécules nucléaires (4) et cytoplasmiques (5-7) ont également été détectées et associées à d'autres collagénoses (8-10). Étant donné que certains de ces anticorps semblent avoir une utilisation diagnostique et/ou pronostique de la sclérodermie généralisée évolutive (11-12), de la connectivité mixte (13-15), du syndrome de Sjögren (16-17), de la polymyosite (18) et de la polyarthrite rhumatoïde (19), le test ANA est maintenant reconnu comme un outil d'analyse général de la collagénose (20).

Les patients atteints d'un LED peuvent produire des anticorps contre plusieurs antigènes nucléaires. Toutefois, les anticorps anti-Sm (antigène Smith) et anti-ADNn présentent la plus forte corrélation avec la maladie (20). Les anticorps anti-Sm présentent une image mouchetée, tandis que les anticorps anti-ADN natif présentent généralement une image homogène. Bien que de faibles taux d'anticorps anti-ADN natif soient souvent présents dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, du syndrome de Sjögren, de sclérodermie généralisée évolutive, de dermatomyosite, de lupus érythémateux discoïde et de connectivité mixte (21), des taux élevés d'anticorps anti-ADN natif sont observés presque exclusivement chez les patients atteints de LED. Les anticorps anti-ADN natif sont considérés comme étant impliqués dans la pathogenèse des variantes les plus graves du LED lorsqu'ils sont déposés comme complexes immuns (22). Les anticorps anti-ADN natif sont observés à titrage élevé et, étant donné qu'ils sont corrélés à l'activité de la maladie (23), leur détection est importante dans la prise en charge des patients souffrant de LED.

Divers tests sont disponibles pour la détection des anticorps anti-ADN natif. Les méthodes les plus couramment utilisées sont l'immunofluorescence indirecte, le dosage radio-immunologique, la contre-immunoelectrophorèse et l'immunodiffusion (24-27). Le système de test ADN natif d'Immuno Concepts utilise la méthode d'immunofluorescence indirecte (IFA). L'anticorps du sérum qui réagit à l'ADNn est détecté par fluorescence du kinétoplaste dans l'organisme *Crithidia luciliae* (34). *C. luciliae* est un parasite de la mouche à viande non pathogène pour l'homme. Le kinétoplaste de ces flagellés parasites du sang fait partie de la grosse mitochondrie dans laquelle l'ADNn hélicoïdal est concentré (33-34). Dans les micrographies électroniques, le kinétoplaste apparaît comme une structure en forme de disque, légèrement concave contenant des crêtes de mitochondries et une masse d'ADN fibreux (35). Le kinétoplaste se trouve entre le noyau situé au centre et le corps basal du flagelle. Étant donné que l'ADN natif du kinétoplaste ne contient pas de contaminants à ADN simple brin, les éventuels problèmes de réactions faussement positives à l'ADN simple brin, qui peuvent survenir lors du radio-immunodosage de l'ADN de thymus de veau, sont quasiment éliminés (28-33).

PRINCIPE DU TEST

Le test ADN natif d'Immuno Concepts utilise la technique d'immunofluorescence indirecte initialement décrite par Weller et Coons (36). Les échantillons du patient sont mis à incuber avec le substrat antigénique afin de permettre la liaison spécifique des auto-anticorps à l'ADN natif du kinétoplaste. En présence d'anticorps anti-ADN natif, un complexe antigène-anticorps stable se forme. Après le rinçage destiné à éliminer les anticorps non liés spécifiquement, le substrat est mis à incuber avec un réactif d'anticorps anti-humain conjugué à de la fluorescéine. Lorsque les résultats sont positifs, on observe la formation d'un complexe tripartite stable composé d'un anticorps

fluorescent lié à l'anticorps anti-ADNn humain, lui-même lié à l'antigène ADNn. Ce complexe peut être visualisé à l'aide d'un microscope à fluorescence. En cas de positivité de l'échantillon, le kinétoplaste, et parfois le noyau, présentent une fluorescence vert pomme intense dans les organismes *Crithidia luciliae*. Si l'échantillon est négatif pour l'ADNn, le kinétoplaste ne présentera aucune fluorescence.

COMPOSITION DES SYSTÈMES (MATÉRIELS FOURNIS)

Utilisation : Tous les composants sont prêts à l'emploi et ne requièrent ni aliquotage ni reconstitution (sauf pour le tampon PBS qui doit être dissous dans une eau désionisée ou distillée avant utilisation).

Conservation : Tous les composants doivent être conservés au réfrigérateur entre 2 et 10 °C. Après reconstitution, le tampon PBS doit être conservé dans un récipient à bouchon à vis au réfrigérateur entre 2 et 10 °C.

Stabilité : Tous les composants sont stables pendant 12 mois à partir de la date de fabrication. Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.

RÉACTIFS

Lames de substrat : * Réf. catalogue 3007 (sept puits) ; 3013 (treize puits). Lames de substrat d'ADNn à sept ou treize puits utilisant des *Crithidia luciliae* stabilisées directement sur les puits du test. Le concept unique de la lame recouverte de téflon (Moat) évite toute contamination croisée entre les puits pendant le test. Les lames comprennent des puits de contrôle (positif, négatif et PBS) pour faciliter l'interprétation des résultats.

Contrôle positif : Réf. catalogue 3021. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain positif riche en anticorps spécifiques aux antigènes ADNn. On observe une image fluorescente positive brillante sur le kinétoplaste du sérum sur le substrat *Crithidia luciliae* d'Immuno Concepts. Ce réactif contient 0,1 % d'azide de sodium (conservateur).

Sérum de contrôle titrable : Réf. catalogue 3026. Flacon prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain positif, qui doit être traité comme un échantillon patient pur (non dilué). Ce réactif contient 0,1 % d'azide de sodium (conservateur). Voir l'étiquette du flacon pour connaître le titre.

Sérum de contrôle négatif : Réf. catalogue 3031. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 1,0 ml de sérum de contrôle humain négatif. Le sérum de contrôle négatif ne présente pas de fluorescence spécifique du kinétoplaste sur le substrat *Crithidia luciliae* d'Immuno Concepts. Ce réactif contient 0,1 % d'azide de sodium (conservateur).

Réactif immunofluorescent : Réf. catalogue 3009 (9,0 ml), 3075 (23 ml). Globuline de chèvre anti-IgG humaine (chaînes lourdes et légères) conjuguée à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Les kits de test complets comprennent des flacons compte-gouttes de précision prêts à l'emploi. Chaque flacon contient 9,0 ml de réactif, soit la quantité suffisante pour 10 lames. Ce réactif contient 0,1 % d'azide de sodium (conservateur).

* Cette lame est protégée par un ou plusieurs des brevets suivants déposés aux États-Unis et à l'étranger : 4387972, D-274261, D-273261, brevet canadien 1171302 et autres brevets en attente.

RÉACTIFS NÉGATIFS

Poudre tampon PBS : Réf. catalogue 1011. Solution saline en poudre tamponnée au phosphate (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Chaque sachet contient une quantité suffisante de poudre tampon pour préparer 1 litre de solution. Chaque kit de test complet contient un sachet de poudre tampon pour cinq lames.

Préparation : Dissoudre un sachet de poudre tampon dans 1 litre d'eau désionisée ou distillée, couvrir puis conserver au réfrigérateur entre 2 et 10 °C pendant quatre semaines maximum ou jusqu'à ce que des signes de contamination ou de modifications visibles apparaissent.

Milieu de montage semi-permanent : Réf. catalogue 1111. Flacon compte-gouttes prêt à l'emploi contenant 5,0 ml de milieu de montage à base de glycérol, pH 9,1 ± 0,2. Ce réactif contient 0,1 % d'azide de sodium (conservateur).

Lamelles couvre-objet : Référence catalogue 1041.
Chaque paquet contient 10 lamelles couvre-objet en verre n°1 de 24 x 60 mm.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE REQUIS (MAIS NON FOURNI)

- Pipettes volumétriques permettant de prélever 20 à 25 µl
- Jarres Coplin ou cuves à coloration
- Pissette en plastique ou pipettes Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Eau désionisée ou distillée
- Tubes à essai pour préparer les dilutions de sérum
- Papier absorbant ou serviettes en papier
- Gants en latex jetables
- Récipients à bouchon à vis d'un litre (pour tampon PBS)
- Chronomètre de laboratoire
- Microscope à fluorescence équipé d'un filtre d'excitation de 495 nm et d'un filtre d'émission de 515 nm.

PRÉCAUTIONS

1. Tous les matériels d'origine humaine utilisés dans la préparation des contrôles pour ce produit ont été testés et se sont révélés négatifs (non-réactivité répétée) vis-à-vis des anticorps des virus de l'immunodéficience humaine 1 et 2 (VIH 1 et 2), de l'anticorps du virus de l'hépatite C (HCV) et de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg), selon les méthodes approuvées par la FDA. Aucune méthode de test ne peut assurer totalement l'absence de VIH-1, VIH-2, virus de l'hépatite C, virus de l'hépatite B ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, tous les sérums de contrôle doivent être manipulés de la même manière que des matériels considérés comme potentiellement infectieux.
2. Tous les échantillons de patient doivent être manipulés conformément aux recommandations du niveau de biosécurité 2 comme pour tout échantillon de sérum ou de sang humain potentiellement infectieux, telles qu'indiquées dans le manuel du Centers for Disease Control/National Institutes of Health : Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1984 Edition.
3. La dilution des composants ou l'utilisation de composants autres que ceux fournis dans ce kit peut donner lieu à des résultats incohérents.
4. L'azide de sodium (0,1 %) est utilisé comme conservateur. Il est possible que l'azide de sodium réagisse au contact des canalisations en plomb ou en cuivre et forme des sels d'azides métalliques explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer abondamment les canalisations avec de l'eau afin d'éviter toute accumulation de résidus. L'azide de sodium est un poison et peut être toxique en cas d'ingestion.
5. Ce kit est destiné à une utilisation diagnostique *in vitro*.
6. En cas d'utilisation de sérums hémolysés ou lipémiques, il est conseillé de procéder à une inactivation de 30 minutes à 56 °C pour obtenir des résultats optimaux. Ne pas utiliser les sérums contaminés d'un point de vue microbien.
7. Le sérum de contrôle titrable est destiné à être utilisé pour surveiller la reproductibilité inter-lot et inter-analyse. Il n'est pas destiné à mesurer la sensibilité ou la spécificité globale du dosage.
8. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
9. Éviter toute éclaboussure ou pulvérisation d'aérosols à tout moment.
10. Les durées et températures d'incubation autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés.
11. La contamination croisée des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
12. Avant utilisation, la verrerie réutilisable doit être lavée et rincée soigneusement afin d'éliminer tout détergent. Toute la verrerie doit être propre et sèche avant utilisation.
13. Avant utilisation, porter les réactifs, lames et échantillons à température ambiante (18-24 °C).
14. Porter des gants en latex jetables pour manipuler les échantillons et réactifs puis se laver soigneusement les mains par la suite.
15. La contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
16. Ne pas pipeter avec la bouche et éviter tout contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs et les échantillons. En cas de contact, laver abondamment avec un savon germicide et de

PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

Prélèvement : Le sérum est l'échantillon préférentiel. Environ 5 ml de sang entier doivent être prélevés de manière aseptique par ponction veineuse à l'aide d'un tube à prélèvement sous vide stérile ou tout autre système de prélèvement adapté. Laisser le sang coaguler à température ambiante (18-24 °C). Le sérum doit être séparé du caillot par centrifugation aussi rapidement que possible, de façon à limiter l'hémolyse.

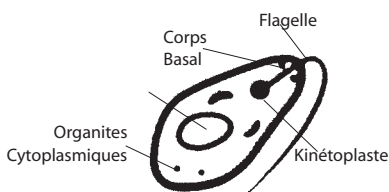
Substances interférentes : Les sérums présentant un degré élevé d'hémolyse, d'ictère, de lipémie ou de prolifération microbienne doivent être écartés car ces anomalies peuvent engendrer des résultats aberrants. Les échantillons contenant des particules visibles doivent être clarifiés par centrifugation avant de procéder au test.

Conservation : Les sérums peuvent être conservés entre 2 et 10 °C pendant une semaine maximum. Si le test est reporté, ils doivent être congelés à -20 °C minimum. Le sérum ne doit pas être conservé dans un réfrigérateur ou un congélateur à dégivrage automatique.

ATTENTION : Les congélations et décongélations successives des échantillons de patient peuvent induire des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'interprétation des résultats dépend de l'identification des diverses caractéristiques morphologiques de *Crithidia luciliae*.



Le revêtement extérieur de la plupart des protozoaires est une pellicule composée de lipoprotéines. Dans la pellicule se trouve la membrane plasmique. La membrane plasmique renferme le cytoplasme consistant en a) une couche ectoplasmique externe contenant le corps basal et le flagelle et b) l'endoplasme, un cytoplasme interne très fluide contenant le noyau, le kinétoplaste et les autres organites.

La pellicule, la membrane plasmique, le corps basal et le flagelle sont généralement considérés comme des éléments permanents de l'organisme, dont l'emplacement varie peu d'une cellule à l'autre. Bien que le kinétoplaste se situe généralement plus près du corps basal que du noyau, l'emplacement exact de cet organite peut varier d'une cellule à l'autre en raison de la fluidité de l'endoplasme.

Afin de clairement différencier le kinétoplaste du noyau, examiner le puits du contrôle positif. Le kinétoplaste sera toujours plus près du flagelle (illustration ci-dessus). Le puits du contrôle négatif ne présente aucune fluorescence du kinétoplaste, contrairement à celui du contrôle positif.

NE LIRE QUE LES ORGANISMES SIMPLES BIEN DÉFINIS DANS CHAQUE CHAMP. LA MORPHOLOGIE PEUT VARIER D'UN ORGANISME À L'AUTRE EN RAISON DE LA FIXATION PENDANT LA PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les contrôles positif, négatif et PBS doivent être effectués dans les puits dédiés au contrôle qualité sur chaque lame. Le contrôle positif doit présenter une fluorescence verte comme intense dans le kinétoplaste des *Crithidia luciliae*, avec ou sans coloration du noyau. Le contrôle négatif ne présente aucune fluorescence du kinétoplaste. Le contrôle PBS est utilisé pour observer la fluorescence non spécifique par le réactif anticorps et ne doit présenter aucune fluorescence verte. Si les contrôles n'apparaissent pas tel que décrit, le test n'est pas valable et doit être recommencé.

CONTRÔLE TITRABLE OPTIONNEL

Lors de la lecture des titres, de nombreux laboratoires commencent par lire le puits qui contient l'échantillon le plus dilué puis poursuivent « à rebours » jusqu'à la dilution 1:10. Le premier puits dans lequel une fluorescence du kinétoplaste clairement perceptible est visible est le résultat du titrage. Nous recommandons cette tech-

nique pour la détermination des résultats du titrage.

Le titre moyen et la plage de titrage (\pm une dilution de part et d'autre de la moyenne) déterminés pour ce numéro de lot ont été établis dans notre laboratoire et sont communiqués à titre indicatif. Ce contrôle est fourni pour permettre à chaque laboratoire d'évaluer la reproductibilité (précision) de son test ADNn. Étant donné que ce contrôle n'est pas destiné à être un indicateur de la précision du titrage, chaque laboratoire doit établir sa propre référence de titrage moyen pour cet échantillon et utiliser cette information pour évaluer la reproductibilité inter-analyse (précision).

Par de multiples dosages de ce contrôle titrable réalisés à l'aide du système de test ADNn fluorescent d'Immuno Concepts, une valeur de titre moyen a été établie pour chaque numéro de lot. Le numéro de lot, le titre moyen et la plage de titrage (\pm une double dilution de part et d'autre de la moyenne) sont indiqués sur l'étiquette du flacon et doivent être utilisés à titre indicatif.

Les valeurs obtenues dans notre laboratoire peuvent différer de vos propres valeurs. De nombreux facteurs peuvent affecter vos résultats, notamment les éléments suivants :

1. Type de source lumineuse utilisé. Les sources de lumière au mercure généreront une plus grande énergie d'excitation à 495 nm que le quartz/l'halogène. Les sources de lumière au mercure 50 watts, 100 watts et 200 watts diffèrent peu en matière d'énergie d'excitation à 495 nm. Les sources de lumière au quartz/l'halogène 100 watts produiront une plus grande énergie d'excitation à 495 nm que le quartz/l'halogène 50 watts.
2. État et âge de la source lumineuse. Cela est particulièrement vrai pour les sources de lumière au mercure qui affichent généralement une réduction progressive de l'énergie d'excitation à 495 nm avant de griller. Cette réduction progressive peut entraîner une perte de sensibilité significative au fil des semaines. Ce problème peut être résolu par la tenue d'un journal. Pour de meilleurs résultats, remplacer les ampoules au mercure de 50 watts toutes les 100 heures et les ampoules au mercure de 100 ou 200 watts toutes les 200 heures. Les sources de lumière au quartz/halogène n'affichent généralement pas de réduction progressive de l'énergie d'excitation avant de griller.
3. Type de filtre d'excitation utilisé. Les filtres d'excitation interférentiels offrent une plus grande sensibilité sur une longueur d'onde beaucoup plus étroite que les filtres d'excitation absorbants. Se reporter au manuel du microscope à fluorescence ou contacter le représentant pour plus d'informations.
4. Alignement correct de l'axe optique du microscope. Pour les instructions, se reporter au manuel du microscope à fluorescence.
5. Ouverture numérique de l'objectif. Grâce à la lumière incidente (Epi), la fluorescence augmente de manière exponentielle à mesure que l'ouverture numérique (ON) de l'objectif augmente. Cela peut conduire un objectif 40X avec une ON de 0,65 à lire une ou plusieurs dilutions inférieures à un objectif 40X avec une ON de 0,85. L'ouverture numérique est indiquée sur le côté de l'objectif.
6. Filtres de suppression. Les filtres de suppression réduisent les longueurs d'onde d'excitation spécifiques et peuvent être utilisés pour réduire la sensibilité. Se reporter au manuel du microscope à fluorescence ou contacter le représentant pour plus d'informations.
7. Précision et exactitude de la technique de dilution, de l'équipement et de la réalisation des procédures de test.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU PATIENT

Un grossissement total de 400X est recommandé pour la visualisation des *Crithidia*.

Négatifs : Un sérum est considéré comme négatif aux anticorps anti-ADN natif lorsque la fluorescence du kinétoplaste est inférieure ou égale à celle observée pour le puits du contrôle négatif. Une fluorescence nucléaire, sans coloration du kinétoplaste, est également considérée comme négative aux anticorps anti-ADN natif.

Positifs : Un échantillon de sérum est considéré comme positif si le kinétoplaste présente une fluorescence clairement visible, supérieure à celle du puits du contrôle négatif.

Titres : Lors de la lecture des titres, de nombreux laboratoires commencent par lire le puits qui contient

l'échantillon le plus dilué puis poursuivent (« à rebours ») jusqu'à la dilution 1:10. Le premier puits dans lequel une fluorescence du kinétoplaste clairement perceptible est visible est le résultat du titrage. Nous recommandons cette technique pour la détermination des résultats du titrage.

INTENSITÉ DE LA FLOUORESCENCE

L'intensité fluorescente peut être semi-quantifiée à l'aide des directives établies par le Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta (Georgie) pour les réactifs immunofluorescents.

- 4+ Jaune-vert intense (fluorescence maximale)
- 3+ Fluorescence jaune-vert moins intense
- 2+ Image cellulaire nette mais faible fluorescence
- 1+ Fluorescence très voilée

Une lame standard pour la détermination de ces intensités fluorescentes, FITC QC Slide™, référence catalogue 1900, est disponible auprès d'Immuno Concepts N.A., Ltd.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Test : Les résultats doivent être notés positifs ou négatifs à la dilution 1:10.

Titrage : Les résultats doivent être communiqués comme la dernière des dilutions successives dans laquelle une coloration du kinétoplaste est clairement visible. Les résultats présentant une forte réaction à la dilution 1:640 doivent être notés supérieurs à 1:640.

CARACTÉRISTIQUES DE FLOUORESCENCE

Kinétoplaste : Fluorescence lisse ou périphérique du kinétoplaste située près de la région flagellaire de l'organisme.

Résultat : Positif aux anticorps anti-ADNn.

Antigènes : ADN natif.

Associations cliniques : Les titres élevés suggèrent un LED (20) ou, en cas de LED précédemment diagnostiqué, une maladie récurrente ou une absence de réaction au traitement (21-23).

Noyau : Fluorescence lisse, périphérique ou mouchetée du noyau.

Résultat : Négatif aux anticorps anti-ADNn.

Antigènes : Antigènes associés au noyau (21-23).

Associations cliniques : La collagénose non spécifique peut être indiquée par une fluorescence nucléaire positive.

REMARQUE : Les résultats ANA positifs sur HEP-2 ou autres substrats ne donnent généralement pas la fluorescence nucléaire correspondante sur *C. luciliae*, par exemple un aspect ANA moucheté sur HEP-2 ne présente pas de fluorescence mouchetée sur *C. luciliae*.

Corps basaux : Fluorescence lisse des deux sphères situées au point de fixation du corps de l'organisme au flagelle dans l'ectoplasme.

Synonymes : Pieds basaux.

Résultat : Négatif aux anticorps anti-ADNn.

Antigènes : Antigènes associés au corps basal.

Associations cliniques : Enregistrées chez les patients souffrant de LED ne présentant pas de fluorescence du kinétoplaste ou du noyau (37).

Flagelle : Fluorescence du flagelle de l'organisme.

Synonymes : Région de la queue de l'organisme.

Résultat : Négatif aux anticorps anti-ADNn.

Antigènes : Antigènes associés aux flagelles inconnus.

Associations cliniques : Inconnues.

LIMITES DU TEST

1. Le diagnostic ne peut pas être réalisé sur la base de la détection des anticorps anti-ADN natif seuls. Le médecin doit interpréter ces résultats au regard des antécédents et des symptômes du patient, des observations physiques et d'autres procédures de diagnostic.
2. Le traitement ne doit pas débuter sur la seule base d'un test positif aux anticorps anti-ADN natif. Les indications cliniques, les autres analyses de laboratoire et le diagnostic clinique du médecin doivent être pris en compte avant de commencer tout traitement.
3. Certains médicaments (procainamide, hydralazine...) peuvent provoquer des pathologies similaires au lupus érythémateux. Les patients souffrant de lupus érythémateux induit par des médicaments peuvent présenter des ANA positifs généralement dirigés contre les histones nucléaires, bien que des anticorps anti-ADN natif aient également été

observés (38-39).

4. Bien qu'un ADN natif à titrage élevé fasse indéniablement penser à un LED, il ne doit pas être considéré comme un élément diagnostique mais plutôt comme faisant partie des antécédents cliniques d'un patient. Des titres faibles d'anticorps anti-ADN natif sont souvent présents dans les sérums des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, du syndrome de Sjögren, de sclérodermie généralisée évolutive, de dermatomyosite, de lupus érythémateux discoïde et de connectivité mixte (21).
5. En raison des nombreuses options disponibles sur les microscopes à fluorescence, il est recommandé que les sources de lumière, les filtres et les optiques soient normalisés lors de la comparaison des titres de patients entre plusieurs laboratoires.
6. Les patients sous traitement stéroïdien peuvent présenter des résultats négatifs aux anticorps anti-ADN natif (40).

VALEURS ESCOMPTÉES

La valeur escomptée dans la population saine est négative à une dilution de test de 1:10. Certains médicaments, tels l'hydralazine, peuvent induire une production d'anticorps anti-ADN natif (38-39).

PERFORMANCES

Le système de test ADN natif d'Immuno Concepts a été comparé à deux autres tests d'immunofluorescence disponibles sur le marché (41). L'étude a porté sur 103 échantillons de sérum provenant de sujets sains ainsi que de patients atteints notamment de lupus érythémateux disséminé (LED), de connectivité mixte (MCTD), d'une variante Raynaud-sclérodermie généralisée évolutive-CREST (PSS-CREST), de polyarthrite rhumatoïde, d'arthrite rhumatoïde juvénile et d'autres collagénoses. Les sérums ont été testés aux dilutions de test recommandées pour chaque fabricant. Les résultats de l'étude sont résumés dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Diagnostique	Nombre de patients	Immuno Concepts Positif 1:10	Fabricant A Positif 1:10	Fabricant B Positif 1:10
LED	30	13	13	11
MCTD / chevauchement	6	0	0	0
Raynaud PSS-CREST	17	0	0	0
Polyarthrite rhumatoïde	2	0	0	0
Arthrite rhumatoïde juvénile	4	0	0	0
Autres collagénoses	9	0	0	0
Sujets hospitalisés	11	1	1	1
Sujets sains	24	0	0	0

Les sujets hospitalisés positifs à tous les tests ADN natif sur *Citithidia luciliae* présentaient un syndrome rénal auto-immun qui ne permet pas de poser le diagnostic de LED.

PROCÉDURE DE TEST ADN natif FLUORESCENT

- 1. RECONSTITUTION DU TAMPON (PBS)**
Dissoudre le contenu d'un sachet de tampon dans un litre d'eau désionisée ou distillée. Le tampon peut être couvert et conservé à 2-10 °C pendant quatre semaines.
- 2. DILUTION DES ÉCHANTILLONS DES PATIENTS**
Test : Diluer les échantillons à 1:10 en ajoutant 0,1 ml (100 µl) de sérum à 0,9 ml de PBS reconstitué. Titrage semi-quantitatif : Pour procéder à des doubles dilutions successives des échantillons à analyser (ex. : 1:20, 1:40, 1:80...1:640), retirer 0,5 ml de la dilution à 1:10 et la mélanger à 0,5 ml de PBS pour obtenir une dilution à 1:20 puis poursuivre de la même manière.
- 3. DILUTION DU CONTRÔLE TITRABLE OPTIONNEL**
Traiter le contrôle titrable optionnel comme un échantillon de patient non dilué. Diluer le contrôle à 1:10 en ajoutant 0,1 ml (100 µl) de sérum de contrôle à 0,9 ml de PBS reconstitué. Procéder aux doubles dilutions successives du contrôle titrable comme décrit ci-dessus.
- 4. PRÉPARATION DES LAMES DE SUBSTRAT (20-25 µl/puits)**
Sortir les lames des sachets et placer les sérums de contrôle sur les puits de contrôle comme suit : retourner le flacon compte-gouttes du contrôle et le presser légèrement jusqu'à ce qu'une goutte apparaisse à l'extrémité de l'embout. Mettre soigneusement la goutte en contact avec le puits de contrôle approprié en évitant tout contact direct de l'embout du compte-gouttes avec la surface de la lame. Placer le contrôle positif sur le puits marqué « + », le contrôle négatif sur le puits marqué « - » et une goutte de tampon PBS sur le puits marqué « PBS ». Ajouter 1 goutte (20-25 µl) d'échantillon du patient dans les puits numérotés.
ATTENTION : LE CONTACT DIRECT DE L'EMBOU DU COMPTE-GOUTTES AVEC LA SURFACE DE LA LAME PEUT ALTÉRER LE SUBSTRAT ANTIGÉNIQUE.
- 5. INCUBATION DES LAMES (30 minutes ±5 minutes à température ambiante, soit 18-24 °C)**
Placer les lames dans une chambre humide couverte (une boîte de Pétri avec des serviettes en papier humidifiées conviendra). Mettre à incuber, couvercle fermé, pendant 30 minutes (±5 minutes) à température ambiante (18-24 °C).
- 6. RINÇAGE EN TAMPON PBS**
Sortir les lames du plateau de l'incubateur et les rincer rapidement avec le tampon PBS à l'aide d'un flacon gicleur ou d'une pipette Pasteur ou sérologique. Ne pas asperger le tampon directement sur les puits. REMARQUE : Afin d'éviter toute contamination croisée sur les lames à 13 puits, diriger le jet du tampon PBS le long de la ligne médiane de la lame, en l'inclinant d'abord vers les puits 1 à 5 puis vers les puits 6 à 10.
- 7. LAVAGE EN TAMPON PBS (10 minutes)**
Laver la ou les lames pendant 10 minutes avec du PBS dans une cuve à coloration ou une jarre Coplin. Il est recommandé d'agiter légèrement la cuve au moment de l'immersion et du retrait de la lame ainsi qu'à mi-parcours. Ce lavage peut être prolongé de 10 à 30 minutes sans que les résultats des tests finaux n'en soient affectés. Jeter la solution de lavage PBS après utilisation. Pour obtenir des résultats optimaux, changer le tampon PBS à mi-parcours et utiliser un agitateur magnétique.
- 8. RÉACTIF IMMUNOFLUORESCENT (couvrir les puits avec 10 à 12 gouttes)**
Retirer les lames une à une du tampon PBS et les immerger 3 à 5 fois dans de l'eau désionisée ou distillée. Tapoter la tranche de la lame sur du papier absorbant ou des serviettes en papier pour éliminer l'excès d'eau. Remettre immédiatement la lame dans la chambre d'incubation et recouvrir complètement les puits de réactif immunofluorescent. Commencer par placer une goutte sur chaque puits. Recommencer l'opération pour chaque lame. Le réactif immunofluorescent a été titré de façon à compenser l'eau désionisée ou distillée résiduelle restant sur la lame après le rinçage. REMARQUE : Il est important que les puits de la lame ne se dessèchent pas pendant cette procédure sous peine d'altérer le substrat. NE PAS SÉCHER LA LAME OU OUBLIER DE LA RECOUVRIR DE RÉACTIF IMMUNOFLUORESCENT PENDANT PLUS DE 15 SECONDES.
- 9. INCUBATION DES LAMES (30 minutes ±5 minutes à température ambiante, soit 18-24 °C)**
Placer le couvercle sur la chambre d'incubation puis, si la chambre n'est pas opaque, la couvrir d'une serviette en papier pour l'abriter de la lumière. Laisser la ou les lames incuber pendant 30 minutes (±5 minutes) à température ambiante (18-24 °C).
- 10. RINÇAGE EN TAMPON PBS**
Sortir les lames du plateau d'incubation et les rincer rapidement avec du PBS. Ne pas asperger le tampon directement sur les puits.
- 11. LAVAGE EN TAMPON PBS (10 minutes)**
Laver les lames pendant 10 minutes avec du PBS dans une cuve à coloration ou une jarre Coplin. Il est recommandé d'agiter légèrement la cuve au moment de l'immersion et du retrait de la lame ainsi qu'à mi-parcours. Ce lavage peut être prolongé de 10 à 30 minutes sans que les résultats des tests finaux n'en soient affectés.
- 12. MONTAGE DE LA LAMELLE COUVRE-OBJET**
Retirer les lames une à une du tampon PBS et les immerger 3 à 5 fois dans de l'eau désionisée ou distillée. Tapoter la tranche de la lame sur du papier absorbant ou des serviettes en papier pour éliminer l'excès d'eau.
NE PAS SÉCHER LA LAME OU OUBLIER DE LA RECOUVRIR DE LA LAMELLE COUVRE-OBJET PENDANT PLUS DE 15 SECONDES.
Ajouter 4 à 5 gouttes de milieu de montage semi-permanent sur la ligne médiane de chaque lame. Mettre soigneusement la lamelle couvre-objet en place en évitant la formation de bulles d'air ; pour cela, abaisser doucement la lamelle d'un côté de la lame vers l'autre.
REMARQUE : Un excès de milieu de montage sur la lame peut entraîner une forte fluorescence de fond en raison de l'accumulation de lumière ou être à l'origine d'un manque de résolution des cellules (image floue). Afin d'éliminer l'excès de milieu de montage sur la lame, essuyer soigneusement la lamelle couvre-objet avec du papier absorbant ou un nettoyant optique tout en évitant de déplacer la lamelle.

POUR L'Assistance technique : +1 916-363-2649
ou messagerie électronique :
techservice@immunoconcepts.com

SISTEMA DI ANALISI IN FLUORESCENZA DEGLI nDNA

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

USO PREVISTO: analisi in fluorescenza indiretta degli anticorpi per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi anti-nDNA nel siero umano. Il sistema di analisi deve essere utilizzato come ausilio nella diagnosi del lupus eritematoso sistemico.

RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE

Anticorpo antinucleare (ANA) è un termine generico usato per descrivere gli anticorpi contro varie nucleo-proteine cellulari. I primi studi su questi anticorpi, con l'uso di tecniche di immunofluorescenza, rivelarono alcune specificità proteiche nucleari selezionate.(1) A causa dell'alta correlazione dell'ANA positivo con il lupus eritematoso sistemico (SLE), un ANA negativo fu principalmente escluso dalla patologia.(2)

Sebbene anticorpi specifici del DNA continuino a dimostrare un'elevata correlazione della patologia con SLE,(3) è stato scoperto un certo numero di macromolecole nucleari (4) e citoplasmatiche(5-7) associate ad altre patologie del tessuto connettivo.(8-10) Poiché alcuni di questi anticorpi sembrano avere un significato diagnostico e/o prognostico nella sclerosi sistemica progressiva,(11-12) nella malattia mista del tessuto connettivo (13-15), nella sindrome di Sjögren,(16-17) nella polimiosite(18) e/o nell'artrite reumatoide,(19) il test ANA è ora riconosciuto come uno strumento di screening generale per la malattia del tessuto connettivo.(20)

I pazienti con SLE possono produrre anticorpi contro una serie di antigeni nucleari, tuttavia quelli diretti contro l'Sm (antigene Smith) e l'nDNA mostrano la più alta correlazione con la patologia.(20) Gli anticorpi diretti contro Sm mostrano un pattern della colorazione a chiazze mentre quelli diretti contro nDNA in genere mostrano un pattern omogeneo della colorazione ANA. Sebbene possano essere presenti bassi livelli di anticorpi nDNA nel siero di pazienti con artrite reumatoide, sindrome di Sjögren, sclerosi sistemica progressiva, dermatomiositi, lupus eritematoso discoide e malattia mista del tessuto connettivo,(21) alti livelli di anticorpi nDNA sono osservabili quasi esclusivamente nell'SLE. Si ritiene che gli anticorpi contro nDNA siano coinvolti nella patogenesi della maggior parte delle varianti dell'SLE quando depositati come immunocomplessi.(22) Gli anticorpi anti-nDNA si presentano in titolo alto e, poiché si collegano all'attività della patologia,(23) il loro rilevamento è importante nel trattamento di pazienti affetti da SLE.

Sono disponibili parecchi saggi per il rilevamento degli anticorpi anti-nDNA. I metodi più comunemente usati comprendono l'immunofluorescenza indiretta, l'analisi radioimmunologica, la controimmuno-elettroforesi e l'analisi mediante immunodiffusione.(24-27) Il sistema di analisi nDNA della Immuno Concepts è un metodo di immunofluorescenza indiretta (IFA). L'anticorpo del siero, reattivo al nDNA, viene rilevato attraverso la colorazione del cinetoplasto all'interno dell'organismo *Crithidia luciliae*.(34) La *C. luciliae* è un parassita della mosca carnaria e non è patogena per gli esseri umani. Il cinetoplasto di questi emoflagellati fa parte del grande mitocondrio in cui è concentrato l'nDNA a forma di elica.(33-34) Alla micrografia elettronica, il cinetoplasto appare come una struttura a forma di disco, leggermente concava contenente la cresta mitocondriale ed una massa di DNA fibroso.(35) Il cinetoplasto si trova tra il nucleo situato al centro e il corpo basale del flagello. Poiché l'nDNA del cinetoplasto non contiene alcun DNA a filamento singolo (ssDNA), sono virtualmente eliminati contaminanti, potenziali problemi di reazioni falsamente positive del ssDNA che possono presentarsi con l'analisi radioimmunologica del DNA del timo dei bovini.(28-33)

PRINCIPIO DEL TEST

Il sistema di analisi nDNA della IC utilizza il metodo dell'immunofluorescenza indiretta, descritto per la prima volta da Weller e Coons.(36) I campioni del paziente sono incubati con substrato antigene per consentire lo specifico legame degli autoanticorpi all'nDNA del cinetoplasto. Se sono presenti anticorpi anti-nDNA, si forma un complesso stabile antigene-anticorpo. Dopo il lavaggio per rimuovere anticorpi non specifici, il substrato viene incubato con un reagente anticorpo anti-umano coniugato con fluoresceina. Quando i risultati sono positivi, avviene la formazione di un complesso stabile in tre parti composto dall'anticorpo fluorescente legato all'anticorpo anti-nDNA umano che è legato all'antigene nDNA. Tale complesso può essere visualizzato con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza. Nei

campioni positivi, il cinetoplasto o il cinetoplasto e il nucleo mostreranno una brillante fluorescenza verde mela all'interno degli organismi della *Crithidia luciliae*. Se il campione è negativo per nDNA, il cinetoplasto non mostrerà alcuna fluorescenza.

COMPONENTI DEL SISTEMA (MATERIALI FORNITI)

Uso: tutti i componenti sono pronti per l'uso senza che siano necessarie la suddivisione in aliquote o la ricostituzione (tranne il tampone PBS che deve essere sciolto in acqua deionizzata o distillata prima dell'uso).

Conservazione: tutti i componenti possono essere conservati alla temperatura di 2-10°C. Dopo la ricostituzione, il tampone PBS deve essere conservato in contenitori con tappo a vite alla temperatura di 2-10°C.

Stabilità: tutti i componenti restano stabili per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Non usare alcun componente oltre la data di scadenza.

REAGENTI REATTIVI

Vetrini del substrato: * numero di catalogo 3007 (con sette pozzetti); 3013 (con tredici pozzetti). Vetrini per substrato nDNA con sette o tredici pozzetti che usano *Crithidia luciliae* stabilizzati direttamente sui pozzetti di analisi. L'esclusivo design a fossa del vetrino minimizza la contaminazione incrociata dei pozzetti durante l'analisi. I vetrini comprendono dei pozzetti di controllo positivo, negativo e PBS per favorire l'esatta interpretazione dei risultati.

Controllo positivo: numero di catalogo 3021.

Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpi specifici per antigeni nDNA. Questo siero dimostra una reazione positiva a colorazione brillante sul cinetoplasto del substrato *Crithidia luciliae* della IC. Questo reagente contiene sodio azide allo 0,1% come conservante.

Siero di controllo titolabile: numero di catalogo 3026.

Fiala pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo da trattare come campione del paziente, non diluito. Questo reagente contiene sodio azide allo 0,1% come conservante. Vedere l'etichetta della fiala per il valore del titolo.

Siero di controllo negativo: numero di catalogo 3031.

Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano negativo. Il siero di controllo negativo non mostrerà alcuna specifica colorazione del cinetoplasto sul substrato *Crithidia luciliae* della IC. Questo reagente contiene sodio azide allo 0,1% come conservante.

Reagente anticorpo fluorescente: numero di catalogo 3009 (9,0 ml), 3075 (23 ml). Anti-IgG umane di capra (catene pesanti e leggere) coniugate con FITC (fluoresceina isotiocianato, fluoresceina isotiocianato). Il reagente è pronto all'uso e si presenta in flaconi contagocce di precisione con 9,0 ml per ogni 10 vetrini in kit di analisi completi. Questo reagente contiene sodio azide allo 0,1% come conservante.

* Questo vetrino è protetto da uno o più dei seguenti brevetti statunitensi e stranieri: 4387972; D-274261; D-273261; brevetto canadese 1171302 ed altri brevetti in corso di registrazione.

REAGENTI NON REATTIVI

Tampone impregnato di polvere PBS: numero di catalogo 1011. Polvere salina tamponata al fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Ciascuna busta contiene polvere tamponata sufficiente a fare 1 litro. (Nei kit di analisi completi, viene fornita una busta di polvere tamponata per cinque vetrini).

Preparazione: sciogliere una bustina di polvere tamponata in un (1) litro di acqua deionizzata o distillata, coprire e conservare in frigorifero ad una temperatura di 2-10°C per massimo quattro settimane o fino a che non compaiono segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili.

Mezzo di fissaggio semipermanente: numero di catalogo 1111. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 5,0 ml di mezzo di fissaggio a base di glicerolo, pH 9,1 ± 0,2. Questo reagente contiene sodio azide allo 0,1% come conservante.

Vetrini coprioggetto: numero di catalogo 1041. Ciascuna confezione contiene dieci vetrini coprioggetto 24 x 60 mm N. 1.

ALTRI MATERIALI NECESSARI (MA NON FORNITI)

- Pipette volumetriche per l'erogazione di volumi da 20-25 µl.
- Vaschette Coplin o capsule di colorazione.
- Flacone morbido o pipette di Pasteur.
- Pipette sierologiche.
- Acqua deionizzata o distillata.
- Provette per preparare le diluizioni dei sieri.
- Carta bibula o assorbente.
- Guanti a perdere in lattice.
- Contenitori con tappo a vite da un litro (per tamponi PBS).
- Timer da laboratorio.
- Microscopio a fluorescenza dotato di filtro eccitatore da 495 nm e filtro di sbarramento da 515 nm.

PRECAUZIONI

- Tutti i materiali di origine umana usati per la preparazione dei controlli per questo prodotto sono stati analizzati e trovati negativi (non ripetutamente reattivi) per gli anticorpi del virus dell'immunodeficienza umana tipo 1 (HIV-1), del virus della immunodeficienza umana tipo 2 (HIV-2), del virus dell'epatite C (HCV) e per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) con un metodo approvato dalla FDA. Nessun metodo di analisi è in grado di garantire con completa sicurezza che siano assenti HIV-1, HIV-2, virus dell'epatite C, virus dell'epatite B o altri agenti infettivi. Quindi, tutti i sieri di controllo vanno maneggiati secondo le stesse modalità utilizzate per i materiali potenzialmente infettivi.
- Tutti i campioni dei pazienti devono essere maneggiati osservando le precauzioni di sicurezza biologica di livello 2, come raccomandato per ogni siero umano potenzialmente infettivo o per campioni di sangue nel manuale pubblicato per i CDC/NIHM (Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, Centri per il Controllo delle Infezioni/Istituti Nazionali per la Sanità: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Edizione 1984).
- La diluizione di componenti o la sostituzione di componenti diversi da quelli forniti in questo sistema può dare risultati non coerenti.
- Il sodio azide (0,1%) viene usato come conservante. Il sodio azide può reagire nelle tubature di piombo o rame formando sali metallici di azide esplosivi. Quando si eliminano i reagenti, far scorrere grandi quantità di acqua del rubinetto per evitare la formazione di potenziali residui nelle tubature. Il sodio azide è un veleno e può essere tossico se ingerito.
- Questo kit è per uso diagnostico *in vitro*.
- Nel caso debbano essere usati sieri emolizzati o lipemici, per risultati ottimali, inattivare a caldo i sieri per 30 minuti a 56°C. Non usare sieri contaminati microbicamente.
- Il siero di controllo titolabile è destinato ad essere usato nel monitoraggio da lotto a lotto e nella riproducibilità interfase. Non è destinato alla misurazione della sensibilità complessiva o della specificità del dosaggio.
- Non fumare, non mangiare o non bere nelle aree in cui sono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
- Evitare sempre gli spruzzi e la formazione di aerosol.
- Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli specificati possono dare risultati falsi.
- La contaminazione incrociata dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
- Prima dell'uso, la vetreria di laboratorio riutilizzabile deve essere lavata e sciacquata a fondo e completamente liberata da ogni residuo di detergente. Prima dell'uso, tutta la vetreria di laboratorio deve essere pulita e asciutta.
- Prima dell'uso, portare tutti i reagenti, i vetrini e i campioni a temperatura ambiente (18-24°C).
- Indossare guanti a perdere in lattice quando si maneggiano campioni e reagenti e dopo lavare accuratamente le mani.
- La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
- Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la cute e le mucose. In caso di contatto, lavare abbondantemente con un sapone germicida e acqua.

RACCOLTA DI CAMPIONI

Raccolta: il siero è il campione preferito. Devono essere prelevati con tecnica asettica circa 5 ml di sangue intero per venopuntura usando una provetta di raccolta sterile a vuoto o un altro sistema di raccolta adatto. Lasciare che il sangue si coaguli a temperatura ambiente (18-24°C). Non appena possibile, il siero deve essere separato dal coagulo per centrifugazione in modo da minimizzare l'emolisi.

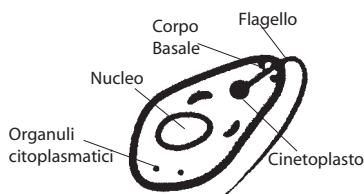
Sostanze interferenti: non vanno usati sieri che mostrano un alto grado di emolisi, ittero, lipemia o crescita microbica, perché queste condizioni possono provocare risultati falsi. Campioni contenenti sostanze particellari visibili vanno chiariti per centrifugazione prima dell'analisi.

Conservazione: i sieri possono essere conservati a 2-10°C fino ad una settimana. Se l'analisi viene ulteriormente rimandata, i sieri devono essere conservati congelati a -20°C o a una temperatura inferiore. Il siero non deve essere conservato in frigoriferi autosbrinatori o in freezer.

ATTENZIONE: il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni dei pazienti può dare origine a falsi risultati positivi o a falsi risultati negativi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La giusta interpretazione dei risultati dipende da una chiara conoscenza delle varie caratteristiche morfologiche dell'organismo della *Crithidia luciliae*.



Il rivestimento esterno della maggior parte dei protozoi consiste di uno strato di pellicola composto di lipoproteina. All'interno della pellicola si trova la membrana plasmatica. La membrana plasmatica racchiude il citoplasma che è formato: a) da uno strato esterno di ectoplasma contenente il corpo basale e il flagello e b) dall'endoplasma, un citoplasma interno molto fluido contenente il nucleo, il cinetoplasto e altro organuli.

La pellicola, la membrana plasmatica, il corpo basale e il flagello sono in genere considerati impianti permanenti all'interno dell'organismo con poca variabilità di posizione da cellula a cellula. Sebbene il cinetoplasto sia generalmente situato più vicino al corpo basale che al nucleo, l'esatta posizione di questo organulo può variare da cellula a cellula a causa della natura fluida dell'endoplasma.

Per differenziare chiaramente il cinetoplasto dal nucleo, osservare la provetta di controllo positivo. Il cinetoplasto sarà sempre più vicino al flagello (come spiegato sopra). Il pozzetto del controllo negativo non mostrerà alcuna colorazione del cinetoplasto, mentre il pozzetto del controllo positivo mostrerà colorazione del cinetoplasto. LEGGERE SOLO I SINGOLI ORGANISMI, BEN DEFINITI, IN CIASCUN CAMPO. LA MORFOLOGIA PUÒ VARIARE DA ORGANISMO A ORGANISMO A CAUSA DELLA FISSAZIONE DURANTE LA FASE DI CRESCITA.

CONTROLLO DELLA QUALITÀ

I controlli positivo, negativo e PBS devono essere analizzati nei pozzetti previsti per il controllo qualità su ciascun vetrino. Il controllo positivo dovrebbe mostrare una luminosa fluorescenza verde mela nel cinetoplasto della *Crithidia luciliae*, con o senza colorazione del nucleo. Il controllo negativo non mostrerà alcuna colorazione del cinetoplasto. Il controllo PBS viene usato per osservare la colorazione non specifica da parte del reagente anticorpo, e non dovrebbe mostrare alcuna fluorescenza verde. Se i controlli non appaiono come descritto, il test non è valido e deve essere ripetuto.

CONTROLLO TITOLABILE OPZIONALE

Nel leggere i titoli, molti laboratori iniziano a leggere dal pozzetto contenente il campione più diluito e leggono "all'indietro" fino alla diluizione 01:10. Il primo pozzetto in cui è visibile una colorazione chiaramente distinguibile è il punto di equivalenza della reazione. <0> Raccomandiamo questa tecnica per determinare i punti di equivalenza della reazione.

Il titolo medio e il range del titolo (\pm una diluizione su ciascun lato della media) determinati per questo numero di lotto sono stati stabiliti nel

nostro laboratorio e sono indicati come guida. Questo controllo è fornito per consentire a ciascun laboratorio di valutare la riproducibilità (di precisione) del proprio test nDNA. Dal momento che questo controllo non è destinato ad essere un indicatore dell'accuratezza del titolo, ciascun laboratorio deve stabilire il proprio punto medio di equivalenza della reazione per questo campione e deve usare tali informazioni per valutare la riproducibilità interfase (di precisione).

Attraverso analisi multiple di questo controllo titolabile, usando il sistema di analisi in fluorescenza nDNA della Immuno Concepts, è stato stabilito un valore medio del titolo per ciascun numero di lotto. Il numero di lotto, il titolo medio e il range del titolo (\pm una duplice diluizione su ciascun lato della media) sono indicati sull'etichetta della fiala e vanno usati come guida della performance del sistema di analisi.

I valori ottenuti nel nostro laboratorio possono essere diversi dai vostri. Di seguito sono indicati alcuni tra i fattori che possono influenzare i risultati.

1. Il tipo di fonte luminosa usata. Fonti luminose al mercurio producono una maggiore energia di eccitazione a 495 nm rispetto a quelle al quarzo/alogene. Le fonti luminose al mercurio da 50 watt, 100 watt e 200 watt differiscono poco nell'energia di eccitazione a 495 nm. Fonti luminose al quarzo/alogene da 100 watt generano una maggiore energia di eccitazione a 495 nm rispetto a quelle al quarzo/alogene da 50 watt.
2. La condizione e l'età della fonte di luce. Questo in particolare per le fonti luminose al mercurio che in genere mostrano una graduale riduzione nell'energia di eccitazione a 495 nm prima di esaurirsi. Questa riduzione graduale dell'energia di eccitazione può comportare una significativa perdita di sensibilità dopo diverse settimane. Questo problema può essere evitato tenendo una registrazione dei tempi. Per risultati ottimali, sostituire le lampadine a mercurio da 50 watt dopo 100 ore e quelle da 100 o 200 watt dopo 200 ore. Le fonti luminose al quarzo/alogene in genere non mostrano una graduale riduzione dell'energia di eccitazione prima di esaurirsi.
3. Il tipo di filtro di eccitazione usato. I filtri eccitatori ad interferenza danno maggiore sensibilità in una lunghezza d'onda molto più ridotta rispetto ai filtri eccitatori ad assorbimento. Per maggiori informazioni, consultare il manuale del proprio microscopio a fluorescenza o contattare il rappresentante.
4. Il giusto allineamento del percorso ottico del microscopio. Per istruzioni, consultare il manuale del proprio microscopio a fluorescenza.
5. L'apertura numerica dell'obiettivo. Con fluorescenza a luce incidente (Epi), la fluorescenza cresce in modo esponenziale man mano che aumenta anche l'apertura numerica (NA) dell'obiettivo. Questo può far sì che un obiettivo da 40X con una NA di 0,65 legga una o più diluizioni più basse rispetto ad un obiettivo da 40X con una NA di 0,85. L'apertura numerica è stampata sul lato dell'obiettivo.
6. I filtri a soppressione. I filtri a soppressione riducono le specifiche lunghezze d'onda dell'eccitazione e possono essere usati per ridurre la sensibilità. Per maggiori informazioni, vedere il manuale del proprio microscopio a fluorescenza o contattare il rappresentante.
7. La precisione e l'accuratezza della tecnica di diluizione, dell'apparecchiatura e della performance delle procedure di analisi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL PAZIENTE

Per visualizzare la *Critithidia* si raccomanda un ingrandimento totale di 400X.

Negativo: un siero si considera negativo per gli anticorpi anti-nDNA se la fluorescenza del cinetoplasto è minore o uguale al pozzetto di controllo negativo. La colorazione nucleare, senza colorazione del cinetoplasto, si considera anch'essa negativa per gli anticorpi anti-nDNA.

Positivo: un siero si considera positivo se il cinetoplasto mostra una colorazione chiaramente distinguibile con fluorescenza maggiore rispetto al pozzetto di controllo negativo.

Titoli: nel leggere i titoli, molti laboratori iniziano a leggere dal pozzetto contenente il campione più diluito e leggono "all'indietro" fino alla diluizione 01:10. Il primo pozzetto in cui è visibile una colorazione chiaramente distinguibile del cinetoplasto è il punto di equivalenza della reazione. Raccomandiamo questa tecnica per determinare i punti di equivalenza della reazione.

INTENSITÀ DELLA FLUORESCENZA

L'intensità della fluorescenza può essere semiquantificata attraverso le seguenti linee guida per i reagenti di anticorpi fluorescenti stabilite dai CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Centri per il controllo e la prevenzione delle patologie) di Atlanta, Georgia.

- 4+ Giallo-verde brillante (fluorescenza massima)
- 3+ Fluorescenza giallo-verde meno brillante
- 2+ Pattern cellulare definito ma fluorescenza debole
- 1+ Fluorescenza molto tenue

Per la determinazione di queste intensità di fluorescenza è disponibile il vetrino standard FITC QC Slide™, numero di catalogo 1900, della Immuno Concepts N.A., Ltd.

RIPORTO DEI RISULTATI

Screening: i risultati devono essere riportati come positivi o negativi a diluizione di 1:10.

Titoli: i risultati vanno riportati come ultima diluizione del siero in cui si vede una colorazione chiaramente distinguibile del cinetoplasto. Risultati con una forte reazione alla diluizione di 1:640 devono essere riportati come maggiori di 1:640.

CARATTERISTICHE DELLA COLORAZIONE

Cinetoplasto: colorazione omogenea o periferica del cinetoplasto vicino alla regione flagellare dell'organismo.

Risultato: positivo per anticorpi anti-nDNA.

Antigeni: nDNA.

Associazione con patologie: titoli alti suggeriscono SLE attiva o, in caso di SLE precedentemente diagnosticata, patologia ricorrente o mancata risposta alla terapia. (20, 21-23)

Nucleo: colorazione omogenea, periferica o a chiazze del nucleo.

Risultato: negativo per anticorpi anti-nDNA.

Antigeni: antigeni nucleari associati. (21-23)

Associazione con patologie: la colorazione nucleare positiva può indicare una malattia non specifica del tessuto connettivo.

NOTA: risultati ANA positivi con HEP-2 o altri substrati, di norma non danno la corrispondente colorazione nucleare sulla *C. luciliae*, ad es. un ANA a chiazze con HEP-2 non mostra colorazione nucleare a chiazze su *C. luciliae*.

Corpi basali: una colorazione omogenea di due sfere situate laddove il corpo dell'organismo si collega al flagello nell'ectoplasma.

Sinonimi: corpi basali.

Risultati: negativo per anticorpi anti-nDNA.

Antigeni: antigeni associati al corpo basale.

Associazione con patologie: riportata in pazienti affetti da SLE che non mostrano colorazione del cinetoplasto o del nucleo. (37)

Flagello: colorazione del flagello dell'organismo.

Sinonimi: regione finale dell'organismo.

Risultati: negativo per anticorpi anti-nDNA.

Antigeni: antigeni sconosciuti associati al flagello.

Associazione con patologie: sconosciuta.

LIMITI DEL TEST

1. Le diagnosi non possono essere fatte solo sulla base del rilevamento dell'anticorpo anti-nDNA. Il medico deve interpretare questi risultati confrontandoli con l'anamnesi e i sintomi del paziente, i dati fisici e altre procedure diagnostiche.
2. La cura non va iniziata sulla sola base di un test positivo per gli anticorpi anti-nDNA. Prima di iniziare qualunque trattamento devono essere considerate indicazioni cliniche, altri risultati di laboratorio e l'impressione clinica del medico.
3. Certi farmaci, tra cui la procainamide e la idralazina, possono indurre una patologia del tipo lupus eritematoso. Pazienti con LE da farmaci possono mostrare ANA positivi comunemente diretti contro gli istoni nucleari, sebbene sia stato riportato anche l'anticorpo anti nDNA. (38-39)
4. Sebbene un nDNA con titolo alto possa essere fortemente indicativo di SLE, ciò non deve essere considerato come diagnostico ma esaminato piuttosto come parte della complessiva storia clinica del paziente. Bassi titoli di anticorpi anti-nDNA sono spesso presenti nel siero di pazienti con artrite reumatoide, sindrome di Sjögren, sclerosi sistemica progressiva, dermatomiositi, lupus eritematoso discoidale e malattia mista del tessuto connettivo. (21)
5. A causa delle numerose opzioni disponibili nei

microscopi a fluorescenza, si raccomanda di standardizzare le fonti luminose, i filtri e gli strumenti ottici in caso di confronto dei titoli dei pazienti tra i vari laboratori.

6. Pazienti sottoposti a terapia con steroidi possono avere risultati negativi per gli anticorpi anti-nDNA.(40)

VALORI ATTESI

Il valore atteso nella popolazione normale è negativo in una diluizione di screening di 1:10. Certi farmaci, come la idralazina, possono indurre una produzione di anticorpi anti-nDNA.(38-39)

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il sistema di analisi nDNA della Immuno Concepts è stato valutato in confronto con altre analisi in fluorescenza degli anticorpi in distribuzione sul mercato.(41) Per lo studio sono stati utilizzati 103 campioni di siero di individui normali e di pazienti con diagnosi comprendenti lupus eritematoso sistemico (SLE), malattia mista del tessuto connettivo (MCTD), variante CREST della sclerosi sistemica progressiva di Raynaud (PSS-CREST), artrite reumatoide (RA), artrite reumatoide giovanile (JRA) ed altre malattie del tessuto connettivo. I sieri sono stati testati alle diluizioni di screening raccomandate da ciascun produttore. Nella tabella 1 che segue sono riassunti i risultati dello studio.

TABELLA 1

Diagnosi	Numero di pazienti	Immuno Concepts Positivi 1:10	Produttore A Positivi 1:10	Produttore B Positivi 1:10
SLE	30	13	13	11
MCTD / coincidenti	6	0	0	0
PSS-CREST di Raynaud	17	0	0	0
RA	2	0	0	0
JRA	4	0	0	0
Altre malattie del tessuto connettivo	9	0	0	0
Controlli ospedalizzati	11	1	1	1
Controlli normali	24	0	0	0

Il controllo ospedalizzato che era positivo a tutte le analisi nDNA *Crithidia luciliae* aveva malattia renale da immunocomplessi non corrispondente ai criteri per la diagnosi di SLE.

PROCEDURA DI ANALISI IN FLUORESCENZA DEGLI μ DNAs

- 1. RICOSTITUZIONE DEL TAMPONE (PBS)**

Sciogliere il contenuto di una busta di tampone in un litro di acqua deionizzata o distillata. Il tampone PBS può essere coperto e conservato a 2-10°C fino a quattro settimane.
- 2. DILUIZIONE DEI CAMPIONI DEI PAZIENTI**

Screening: diluire i campioni dei pazienti a 01:10 aggiungendo 0,1 ml (100 μ l) di siero a 0,9 ml di PBS ricostituito.
Titolo semi-quantitativo: per preparare diluizioni seriali duplici di campioni di screening (ad es. 1:20, 1:40, 1:80...1:640), rimuovere 0,5 ml della diluizione 1:10 e mescolarla con 0,5 ml di PBS per ottenere una diluizione a 1:20, e continuare le diluizioni seriali in tal modo.
- 3. DILUIZIONE OPZIONALE DEL CONTROLLO TITOLABILE**

Trattare il controllo opzionale titolabile come un campione del paziente non diluito. Diluire il controllo a 1:10 aggiungendo 0,1 ml (100 μ l) di siero di controllo a 0,9 ml di PBS ricostituito. Preparare diluizioni seriali duplici del controllo titolabile, come sopra descritto.
- 4. PREPARAZIONE DEI VETRINI DEL SUBSTRATO (20-25 μ l/pozzetto)**

Rimuovere il/i vetrino/i dal contenitore/i e porre i sieri di controllo sui pozzetti di controllo come descritto di seguito. Capovolgere il flacone contagocce di controllo e premere delicatamente fino a che in punta non è visibile la goccia. Appoggiare delicatamente la goccia sul pozzetto di controllo appropriato evitando il contatto diretto della punta del contagocce con la superficie del vetrino. Mettere il controllo positivo sul pozzetto marcato "+", il controllo negativo sul pozzetto marcato "-" e una goccia di tampone PBS sul pozzetto marcato "PBS". Aggiungere 1 goccia (20-25 μ l) di campione del paziente ai pozzetti numerati.
ATTENZIONE: IL CONTATTO DIRETTO DELLA PUNTA DEL CONTAGOCCE CON LA SUPERFICIE DEL VETRINO PUÒ DANNEGGIARE IL SUBSTRATO ANTIGENE.
- 5. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 \pm 5 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-24°C)**

Mettere il/i vetrino/i in una camera umida, coperta (una capsula di Petri con carta assorbente inumidita andrà bene). Incubare, col coperchio, per 30 minuti (\pm 5 minuti) a temperatura ambiente (18-24°C).
- 6. RISCIAQUO COL PBS**

Rimuovere il/i vetrino/i dal piatto dell'incubatore e sciacquare brevemente con PBS usando una bottiglia a zampillo, una pipetta di Pasteur o una pipetta sierologica. Non far zampillare il tampone direttamente sui pozzetti.
NOTA: per evitare la contaminazione incrociata sui vetrini con 13 pozzetti, orientare il flusso di PBS lungo la linea mediana del vetrino, inclinandolo prima verso le provette 1-5 e poi verso quelle 6-10.
- 7. LAVAGGIO COL PBS (10 minuti)**

Lavare il/i vetrino/i per 10 minuti con PBS in un piatto per la colorazione del vetrino o una vaschetta Coplin. Si raccomanda di agitare con delicatezza all'immersione del vetrino, al punto mediano e alla rimozione. Questo lavaggio può durare fino a 10-30 minuti senza che i risultati finali dell'analisi varino. Eliminare la soluzione di lavaggio PBS dopo l'uso. Per risultati ottimali, cambiare il PBS al punto mediano e usare un agitatore magnetico.
- 8. REAGENTE ANTICORPO FLUORESCENTE (coprire i pozzetti con 10-12 gocce)**

Rimuovere uno alla volta i vetrini dal PBS e immergerli 3-5 volte in acqua deionizzata o distillata. Tamponare il vetrino sul lato con carta bibula o con carta assorbente in modo da eliminare l'acqua
- 9. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 \pm 5 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-24°C)**

Mettere il coperchio sulla camera di incubazione e coprire completamente i pozzetti dei vetrini non si asciugano durante questa procedura onde evitare il danneggiamento del substrato.
TAMPONARE O ASCIUGARE IL VETRINO IN MANIERA CHE LO STESSO NON RESTI SENZA REAGENTE ANTICORPO FLUORESCENTE PER PIÙ DI 15 SECONDI.
- 10. RISCIAQUO COL PBS**

Rimuovere il/i vetrino/i dal piatto dell'incubatore e sciacquare brevemente con PBS. Non far zampillare il tampone direttamente sui pozzetti.
- 11. LAVAGGIO COL PBS (10 minuti)**

Lavare il/i vetrino/i per 10 minuti con PBS in un piatto per la colorazione del vetrino o una vaschetta Coplin. Si raccomanda di agitare con delicatezza all'immersione del vetrino, al punto mediano e alla rimozione. Questo lavaggio può durare fino a 10-30 minuti senza che i risultati finali dell'analisi varino.
- 12. MONTAGGIO DEL VETRINO COPRIOGGETTI**

Rimuovere uno alla volta i vetrini dal PBS e immergerli 3-5 volte in acqua deionizzata o distillata. Tamponare il vetrino sul lato con carta bibula o con carta assorbente in modo da eliminare l'acqua in eccesso. TAMPONARE O ASCIUGARE IL VETRINO IN MANIERA CHE NON RIMANGA SENZA COPRIVETRINO PER PIÙ DI 15 SECONDI. Aggiungere 4-5 gocce di mezzo di fissaggio semipermanente lungo la linea mediana di ciascun vetrino. Posizionare con attenzione il vetrino coprioggetto, evitando vuoti d'aria, abbassando delicatamente il vetrino coprioggetto da un estremo all'altro del vetrino.
NOTA: una quantità eccessiva di mezzo di fissaggio sul vetrino può causare un'alta fluorescenza di fondo, dovuta alla dispersione della luce o alla mancanza di risoluzione chiara delle cellule (immagine sfocata). L'eccesso del mezzo di fissaggio può essere eliminato dal vetrino tamponando delicatamente il vetrino coprioggetto con carta assorbente o carta per pulire lenti evitando qualsiasi movimento diretto del vetrino coprioggetto.

PER ASSISTENZA TECNICA: +1 916-363-2649
oppure a mezzo e-mail:
techservice@immunoconcepts.com

SISTEMA DE ANÁLISIS DE ADN POR INMUNO-FLUORESCENCIA

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

USO PREVISTO: Se trata de una determinación indirecta por inmunofluorescencia 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), también 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 selectiva 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 puede haber 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 los niveles 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.

Existen varios análisis para la detección de anticuerpos anti-ADNn. Los métodos más habituales son la inmunofluorescencia indirecta, el radioinmunoanálisis, la contraelectroforesis y la inmunodifusión (24-27). El sistema de análisis de anticuerpos anti-ADNn de Immuno Concepts es un método de detección indirecta de anticuerpos por inmunofluorescencia (IFA). El anticuerpo sérico que reacciona con el ADNn se detecta por la tinción del cinetoplasto situado en el interior del microorganismo *Criethidia luciliae* (34). *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 (33-34). En microfotografías electrónicas, el cinetoplasto aparece como una estructura ligeramente cóncava y discoide que contiene crestas mitocondriales y una masa de ADN fibroso (35). 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 (28-33).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El sistema de análisis de anticuerpos anti-ADNn de IC emplea la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes descrita por primera vez por Weller y Coons (36). 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 incubaba el sustrato con anticuerpos antihumanos conjugados con fluoresceína. Si los resultados son positivos se forma un complejo estable con tres partes: el anticuerpo fluorescente unido al anticuerpo anti-ADNn humano,

unido a su vez al antígeno ADNn. Este complejo se puede visualizar con la ayuda de un microscopio de fluorescencia. En las muestras positivas, el cinetoplasto o el cinetoplasto y el núcleo mostrarán una fluorescencia de color verde manzana brillante en el interior de los microorganismos *Criethidia 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, que debe ser disueltos en agua desionizada o destilada antes de utilizarlo).

Conservación: Todos los componentes se pueden conservar en refrigerador entre 2 y 10 °C. Una vez preparado, el tampón PBS debe conservarse en envases con tapón de rosca, en refrigerador entre 2 y 10 °C.

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.

AGENTES REACTIVOS

Portaobjetos de sustrato: *Nº de catálogo 3007 (siete pocillos); 3013 (trece pocillos). Portaobjetos con siete o trece pocillos con sustrato de ADNn, utilizando *Criethidia 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. Además, los portaobjetos llevan pocillos de control designados como positivo, negativo y PBS, que ayudan a interpretar adecuadamente los resultados.

Control positivo: Nº 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 anti-ADNn. Este suero produce una brillante reacción de tinción positiva en el cinetoplasto del sustrato de *Criethidia luciliae* de Immuno Concepts. Este reactivo contiene azida sódica al 0,1 % como conservante.

Suero de control titulable: Nº 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. Este reactivo contiene azida sódica al 0,1 % como conservante. Consulte el valor de la titulación en la etiqueta del vial.

Suero de control negativo: Nº 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 *Criethidia luciliae* de Immuno Concepts. Este reactivo contiene azida sódica al 0,1 % como conservante.

Reactivo con anticuerpos fluorescentes: Nº de catálogo 3009 (9,0 ml), 3075 (23 ml). IgG de cabra antihumana (cadenas pesadas y ligeras) conjugada con fluoresceína isotiocianato (FITC). 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 reactivo contiene azida sódica al 0,1 % como conservante.

*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.

AGENTES NO REACTIVOS

Polvo tampón PBS: Nº 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 entre 2 y 10 °C durante 4 semanas como máximo, o hasta que aparezcan signos de contaminación u otros cambios visibles.

Medio de montaje semipermanentes: Nº de catálogo 1111. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 5,0 ml de medio para preparaciones microscópicas a base de glicerol, pH 9,1 ± 0,2. Este reactivo

contiene azida sódica al 0,1 % como conservante.

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
Jarras Coplin o platillos de tinción
Frasco para exprimir o pipetas de Pasteur
Pipetas serológicas
Agua desionizada o destilada
Probetas para preparar las diluciones de suero
Papel secante o toallas de papel
Guantes de látex desechables
Envases de un litro con tapón de rosca (para el tampón PBS)
Cronómetro
Microscopio de fluorescencia equipado con un filtro excitador de 495 nm y un filtro de barrera de 515 nm.

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, 1984 Edition.
3. La disolución de los componentes o su sustitución por otros distintos de los suministrados con el sistema puede arrojar resultados incoherentes.
4. Se emplea azida sódica (0,1 %) 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 titulable debe utilizarse para controlar la reproducibilidad 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 de látex 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.

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.

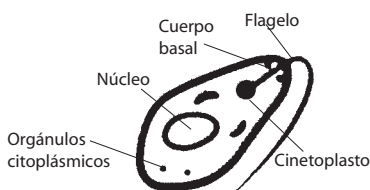
Substancias que interfieren: No se utilizarán sueros que muestren grados elevados de hemólisis, ictericia, lipemia o crecimiento microbiano, pues en todas esas circunstancias se pueden producir resultados falsos. Si la muestra presenta partículas visibles, éstas deben ser eliminadas por centrifugado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

Conservación: Los sueros se pueden conservar entre 2 y 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 o 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 fluorescencia de color verde manzana brillante 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 fluorescencia verde. Si los controles no se ven como se ha descrito, la prueba no es válida y debe repetirse.

CONTROL OPCIONAL DE LA TITULACIÓN

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 discernible de tinción del cinetoplasto corresponde al título que se considera como criterio de valoración. Recomienda-

mos utilizar esta técnica para determinar los criterios de valoración de los títulos.

El título medio y el rango de títulos (\pm una dilución 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 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 anticuerpos anti-ADNn por inmunofluorescencia 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. El tipo de luz utilizada. Las fuentes de luz de mercurio producen una energía de excitación a 495 nm mayor que las de cuarzo/halógenas. Las fuentes de luz de mercurio de 50, 100 y 200 vatios difieren poco en la energía de excitación a 495 nm. Las fuentes de luz de cuarzo/halógenas de 100 vatios producen una energía de excitación a 495 nm superior a la proporcionada por las de cuarzo/halógenas de 50 vatios.
2. El estado de la fuente de luz y su edad. Esto es especialmente cierto para las fuentes de luz de mercurio, que suelen experimentar una reducción gradual de la energía de excitación a 495 nm antes de agotarse. Esta gradual reducción de la energía de excitación puede producir una pérdida significativa de la sensibilidad en un plazo de semanas. El problema se puede evitar con un registro cronológico. Para que los resultados sean óptimos, cambie las bombillas de mercurio de 500 vatios cada 100 horas, y las de 100 ó 200 vatios cada 200 horas. Por lo general, las fuentes de luz de cuarzo/halógenas no experimentan una reducción gradual de la energía de excitación antes de agotarse.
3. El tipo de filtro excitador utilizado. Los filtros excitadores por interferencia proporcionan mayor sensibilidad en una longitud de onda mucho menor que los filtros excitadores por absorción. Si desea más información, consulte el manual de su microscopio de fluorescencia, o con su delegado de ventas.
4. Correcta alineación del haz de luz del microscopio. Consulte las instrucciones del manual del microscopio de fluorescencia.
5. La apertura numérica del objetivo. Si se emplea fluorescencia por luz incidente (Epi), la fluorescencia aumenta exponencialmente con la apertura numérica (NA) del objetivo. Así, puede que un objetivo de 40X con una NA de 0,65 interprete una o más diluciones como inferiores a las determinadas con un objetivo de 40X con una NA de 0,85. La apertura numérica va impresa a un lado del objetivo.
6. Filtros de supresión. Los filtros de supresión reducen longitudes de onda de excitación concretas, y se pueden utilizar para reducir la sensibilidad. Si desea más información, consulte el manual de su microscopio de fluorescencia, o con su delegado de ventas.
7. 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 fluorescencia 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 fluo-

rescencia 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 FLUORESCENCIA

Es posible semicuantificar la intensidad de la fluorescencia con arreglo a las directrices sobre reactivos con anticuerpos fluorescentes establecidas por los Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia (CDC).

- 4+ Verde manzana brillante (fluorescencia máxima)
- 3+ Fluorescencia de color verde manzana menos brillante
- 2+ Patrón celular definido, pero fluorescencia tenue
- 1+ Fluorescencia muy leve

Immuno Concepts, N.A. Ltd. facilita un portaobjetos estándar para la determinación de la intensidad de la fluorescencia, FITC QC Slide™, número de catálogo 1900.

NOTIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS

Selección: Se indicará si el resultado es 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 (37).

Flagelo: Tinción del flagelo del microorganismo.

Sinónimos: Región de la cola del microorganismo.

Resultados: Negativo para anticuerpos anti-ADNn.

Antígenos: Antígenos desconocidos asociados al flagelo.

Asociación a enfermedades: Desconocida.

LIMITACIONES DEL ANÁLISIS

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 (38-39).
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 del tejido conjuntivo (21).
5. Como quiera que existen muchas opciones en los microscopios de fluorescencia, se recomienda estandarizar las fuentes de luz, los filtros y los medios ópticos para comparar los títulos de los pacientes obtenidos en diferentes laboratorios.
6. Los pacientes en tratamiento con esteroides pueden dar resultados negativos para los anticuerpos anti-ADNn (40).

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 (38-39).

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Se ha comparado el sistema de análisis de anticuerpos anti-ADNn de Immuno Concepts con otros dos sistemas de detección de anticuerpos fluorescentes comercializados (41). 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-variante 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 siguiente 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.

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ADNn POR INMUNOFUORESCENCIA

- 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 entre 2 y 10 °C durante cuatro semanas como máximo.
- 2. 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.
- 3. 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.
- 4. 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. Ponga el control positivo en el pocillo marcado "+", el negativo en el marcado "-" y una gota de tampón PBS en el pocillo marcado "PBS". 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 ANTIGENO.**
- 5. 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).
- 6. ENJUAGUE CON PBS**

Saque los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y aclárelos brevemente 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, inclinándolo primero hacia los pocillos 1-5 y luego hacia los pocillos 6-10.
- 7. 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. Se recomienda agitar suavemente al sumergir el portaobjetos, cuando haya pasado la mitad del tiempo y al sacarlo. Este lavado puede durar de 10 a 30 minutos sin que varíen los resultados finales. Una vez utilizada, tire la solución de lavado PBS. Para que los resultados sean óptimos cambie el PBS cuando haya pasado la mitad del tiempo, y utilice un agitador magnético.
- 8. REACTIVO FLUORESCENTE PARA DETECTAR ANTICUERPOS (cubra los pocillos con 10-12 gotas)**

Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno y sumérjalos de 3 a 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 fluorescente para detectar anticuerpos; empiece por poner una gota en cada pocillo. Repita la operación en cada portaobjetos. El reactivo fluorescente 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 SEQUE EL PORTAOBJETOS NI DEJE QUE PASEN MÁS DE 15 SEGUNDOS SIN AÑADIR EL REACTIVO.**
- 9. 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 y cúbrala con una toalla de papel para impedir la exposición a la luz, si la cámara no es opaca. Deje que los portaobjetos se incuben 30 minutos (±5 minutos) a temperatura ambiente (18-24 °C).
- 10. ENJUAGUE CON PBS**

Retire los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y enjuáguelos brevemente con PBS. No utilice la jeringa directamente sobre los pocillos.
- 11. 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. Se recomienda agitar suavemente al sumergir el portaobjetos, cuando haya pasado la mitad del tiempo y al sacarlo. Este lavado puede durar de 10 a 30 minutos sin que varíen los resultados finales.
- 12. PREPARACIÓN DE LOS CUBREOBJETOS**

Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno y sumérjalos de 3 a 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. **NO SEQUE EL PORTAOBJETOS NI DEJE QUE PASEN MÁS DE 15 SEGUNDOS SIN PONER EL CUBREOBJETOS.** Añada 4 ó 5 gotas de medio de montaje 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 puede que la fluorescencia de fondo sea elevada debido a la diseminación de la luz, o 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.

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

NDNA-FLUORESCENZ-TESTSYSTEM NUR ZUR IN VITRO-DIAGNOSTIK

INDIKATION: Dies ist ein indirekter Fluoreszenz-Antikörper-test für den semiquantitativen Nachweis von anti-nDNA Antikörpern in humanem Serum. Der Test dient als Hilfestellung bei der Diagnose von systemischem Lupus erythematosus.

ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG DES TESTS

Der Terminus antinukleäre Antikörper (ANA) ist ein Oberbegriff zur Beschreibung von Autoantikörpern gegen verschiedene Zellkernproteine. Frühere Studien dieser Autoantikörper, die mit Immunofluoreszenztechniken arbeiteten, haben einige wenige Spezifitäten von Zellkernproteinen aufgezeigt (1). Wegen der hohen Korrelation positiver ANA mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) ist diese Erkrankung bei negativen ANA grundsätzlich auszuschließen (2).

Auch wenn DNA-spezifische Antikörper weiterhin eine hohe Korrelation mit SLE (3) aufweisen, wurde in den letzten Jahren eine Reihe nukleärer (4) und zytoplasmischer (5-7) Makromoleküle nachgewiesen und mit anderen Bindegewebskrankungen in Verbindung gebracht (8-10). Einige dieser Antikörper haben offenbar einen diagnostischen und/oder prognostischen Wert bei systemischer Sklerose (11, -12), gemischter Bindegewebskrankheit (13-15), Sjögren-Syndrom (16, -17), Polymyositis (18) und rheumatoider Arthritis (19). Aus diesem Grunde werden ANA Tests mittlerweile als allgemeine Screening-Methode zum Nachweis von Bindegewebskrankheit anerkannt (20).

Patienten mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) können Antikörper gegen eine ganze Reihe nukleärer Antigene produzieren. Die gegen Sm (Smith-Antigen) und nDNA gerichteten Antikörper zeigen jedoch die höchste Korrelation mit der Krankheit (20). Gegen Sm gerichtete Antikörper weisen eine gefleckte ANA-Färbung auf, gegen nDNA gerichtete Antikörper erzeugen indessen eine homogene ANA-Färbung. Auch wenn im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom, progressiver systemischer Sklerose, Dermatomyositis, diskoidem Lupus erythematosus und gemischter Bindegewebskrankheit (21) niedrige Spiegel von nDNA-Antikörpern vorhanden sind, so treten hohe Spiegel von nDNA-Antikörpern dagegen fast ausschließlich bei SLE auf. Man geht davon aus, dass Antikörper gegen nDNA an der Pathogenese der meisten schweren Varianten von SLE beteiligt sind, wenn sie als Immunkomplex abgelagert werden (22). Antikörper gegen nDNA treten bei hohen Titrierungen auf, und da sie mit der Krankheitsaktivität korrelieren (23), ist ihr Nachweis für die Behandlung von SLE-Patienten von Bedeutung.

Für den Nachweis von nDNA-Antikörpern steht eine Reihe von Assays zur Verfügung. Zu den am häufigsten verwendeten Methoden zählen indirekte Immunofluoreszenz, Radioimmuntest, Kontraimmunelektrophorese und Immundiffusion (24-27). Das nDNA-Testsystem von Immuno Concepts arbeitet mit der Methode der indirekten Fluoreszenz-Antikörper (IFA). Serum-Antikörper mit Reaktivität auf nDNA werden durch Verfarbung des Kinetoplast im Organismus *Criethidia luciliae* nachgewiesen (34). *C. luciliae* ist ein für Menschen opathogener Parasit der Schmeißfliege. Der Kinetoplast dieser Hämoflagellaten ist Teil des großen Mitochondriums, in dem die helixförmige nDNA konzentriert ist (33-34). Im Elektronenmikroskop erscheint der Kinetoplast als leicht konkave, scheibenförmige Struktur, die mitochondriale Cristae und fibröse DNA-Masse enthält (35). Der Kinetoplast liegt zwischen dem zentralen Nukleus und dem Basalkörper des Flagellum. Da die nDNA des Kinetoplast keine Kontamination durch einstrangige DNA (ssDNA) aufweist, werden mögliche Probleme mit falsch-positiven Reaktionen auf ssDNA, die bei einem Radioimmuntest mit Kalbsthymus-DNA auftreten können, so gut wie eliminiert (28-33).

TESTPRINZIP

Das IC nDNA Testsystem arbeitet mit der Methode der indirekten Fluoreszenz-Antikörper, wie sie von Weller und Coons zuerst beschrieben wurde (36). Dabei werden Patientenproben mit Antigensubstrat inkubiert, um spezifische Bindungen von Autoantikörpern an Kinetoplast-nDNA zu ermöglichen. Wenn nDNA-Antikörper vorhanden sind, bildet sich ein stabiler Antigen-Antikörperkomplex. Nach dem Waschen, bei dem nicht-spezifische Antikörper entfernt werden, wird das Substrat mit einem anti-Human-Antikörperreagens, das an Fluoreszein konjugiert ist, inkubiert. Bei positivem Ergebnis bildet sich ein stabiler dreiteiliger Komplex, bestehend aus an humane anti-nDNA-Antikörper gebundenen Fluoreszenz-Antikörpern, welche ihrerseits

an nDNA-Antigen gebunden sind. Dieser Komplex kann mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops sichtbar gemacht werden. In positiven Proben weisen der Kinetoplast oder Kinetoplast und Nukleus eine helle apfelgrüne Fluoreszenz im Organismus von *Criethidia luciliae* auf. Wenn die Probe für nDNA negativ ist, zeigt der Kinetoplast keinerlei Fluoreszenz.

SYSTEMKOMPONENTEN (IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)

Verwendung: Sämtliche Komponenten werden gebrauchsfertig geliefert, ohne dass Aliquotieren oder eine Rekonstitution erforderlich sind (mit Ausnahme des PBS-Puffers, der vor Gebrauch in deionisiertem oder destilliertem Wasser aufgelöst werden muss).

Aufbewahrung: Alle Komponenten können gekühlt bei 2-10 °C aufbewahrt werden. Nach Rekonstitution sollte PBS-Puffer in Behältern mit Schraubverschluss bei 2-10 °C aufbewahrt werden.

Stabilität: Alle Komponenten sind bis mindestens 12 Monate nach Herstellungsdatum stabil. Keine Komponenten nach Überschreiten des Verfallsdatums verwenden.

REAKTIVE REAGENZIEN

Substratträger: *Katalognummer 3007 (sieben Vertiefungen); 3013 (dreizehn Vertiefungen). Objektträger für nDNA-Substrat mit sieben bzw. dreizehn Vertiefungen, mit direkt in den Testvertiefungen stabilisierter *Criethidia luciliae*. Durch eine spezielle Konstruktion wird die Gefahr der Kreuzkontamination der Vertiefungen bei den Tests minimiert. Die Objektträger beinhalten Kontrollvertiefungen für positive, negative und PBS-Reagenzien zur Erleichterung der korrekten Interpretation der Ergebnisse.

Positivkontrolle: Katalognummer 3021. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 1,0 ml positivem Human-Kontrollserum mit nDNA-Antigen-spezifischen Antikörpern. Dieses Serum erzeugt eine helle positive Verfärbungsreaktion des Kinetoplast auf dem *Criethidia luciliae*-Substrat von Immuno Concepts. Dieses Reagens enthält 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel.

Titrierbares Kontrollserum: Katalognummer 3026. Gebrauchsfertiges Fläschchen mit 1,0 ml positivem Human-Kontrollserum zur unverdünnten Verwendung als Patientenprobe. Dieses Reagens enthält 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Siehe Etikett für Titrierungswert.

Negativkontrollserum: Katalognummer 3031. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 1,0 ml negativem Human-Kontrollserum. Das Negativkontrollserum erzeugt keinerlei spezifische Verfärbung des Kinetoplast auf dem *Criethidia luciliae*-Substrat von Immuno Concepts. Dieses Reagens enthält 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel.

Fluoreszenz-Antikörperreagens: Katalognummer 3009 (9,0 ml), 3075 (23 ml). Anti-human-IgG, (schwere und leichte Ketten) von der Ziege, an Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert. Gebrauchsfertiges Reagens in Präzisions-Tropffläschchen mit 9,0 ml für alle 10 Objektträger im Lieferumfang des Testkits. Dieses Reagens enthält 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel.

**Dieser Objektträger ist durch mindestens eines der folgenden US- und anderen Patente geschützt: 4387972, D-274261, D-273261, Patent 1171302 in Kanada, andere Patente angemeldet.*

NICHT-REAKTIVE REAGENZIEN

PBS-Waschpuffer: Katalognummer 1011. Phosphat-gespuffertes Kochsalzpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Jeder Beutelinhalt reicht für 1 Liter gebrauchsfertigen Puffer. (Ein Beutel Pufferpulver für je fünf Objektträger ist im Lieferumfang des Testkits enthalten).

Herstellung: Einen Beutel Pufferpulver in 1 Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen und gekühlt bei 2-10 °C bis zu 4 Wochen aufbewahren, oder bis Anzeichen von Kontamination oder andere sichtbare Veränderungen zu erkennen sind.

Semipermanentes Eindeckmedium: Katalognummer 1111. Gebrauchsfertiges Tropf-Fläschchen mit 5,0 ml Glycerol-basiertem Montagemedium, pH 9,1 ± 0,2. Dieses Reagens enthält 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel.

Deckgläser: Katalognummer 1041. Jede Packung enthält zehn Deckgläser 24x60 mm Nr. 1.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)

Präzisionspipetten für Volumina von 20-25 µl.
Coplin-Glaszylinder oder Färbungsschalen
Spritzflasche oder Pasteur-Pipetten
Serologische Pipetten.
Deionisiertes oder destilliertes Wasser.
Teströhrchen zur Herstellung von Serumverdünnungen.
Saugpapier oder Papierhandtücher.
Einmal-Latexhandschuhe.
Mehrere 1-Liter-Behälter mit Schraubverschluss (für PBS-Waschpuffer).
Laborstoppuhr.
Fluoreszenz-Mikroskop mit 495 nm Erregerfilter und 515 nm Sperfilter.

SICHERHEITSHINWEISE

1. Sämtliche zur Herstellung von Kontrollseren für dieses Produkt verwendeten Materialien humanen Ursprungs wurden nach von der FDA anerkannten Methoden negativ (nicht wiederholt reaktiv) auf Antikörper gegen HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C (HCV) und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) getestet. Keine Testmethode kann jedoch mit absoluter Sicherheit nachweisen, dass keine HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C oder Hepatitis-B-Viren oder andere infektiöse Agenten vorhanden sind. Daher sollten alle Kontrollseren wie potenziell infektiöse Materialien gehandhabt werden.
2. Alle Patientenproben sollten nach den Anforderungen für Biosafety Level 2 behandelt werden, wie für potenziell infektiöses humanes Serum und andere Blutbestandteile empfohlen in: Centers for Disease Control / National Institutes of Health Manual: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Ausgabe 1984.
3. Ein Verdünnen der Bestandteile oder eine Zugabe von nicht zum Kit gehörenden Reagenzien kann die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (0,1 %) als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferinstallationen reagieren und hochexplosive Metallazidsalze bilden. Beim Entsorgen der Reagenzien mit reichlich Leitungswasser nachspülen, damit im Abfluss keine Rückstände verbleiben. Natriumazid ist giftig und kann bei Verschlucken toxisch wirken.
5. Der Kit ist ausschließlich zur *In vitro*-Diagnostik bestimmt.
6. Falls hämolytierte oder lipämische Seren verwendet werden müssen, die Seren durch Hitzeinwirkung (30 Minuten bei 56 °C) inaktivieren, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Mikrobiell kontaminierte Seren dürfen nicht verwendet werden.
7. Das titrierbare Kontrollserum ist für die Überwachung der Chargen- und Testlauf-übergreifenden Reproduzierbarkeit bestimmt. Es ist nicht zur Messung der Gesamtsensibilität oder Spezifität des Tests bestimmt.
8. In Bereichen, in denen mit Patientenproben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
9. Verspritzen von Reagenzien und Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
10. Die angegebenen Inkubationszeiten und Temperaturwerte genau einhalten, andernfalls könnten die Ergebnisse verfälscht werden.
11. Eine Kreuzkontamination der Reagenzien oder Proben kann ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.
12. Wiederverwendbare Glasartikel müssen vor Gebrauch gewaschen und gründlich ausgespült werden, um sämtliche Waschmittelrückstände zu entfernen. Die Glasartikel müssen vor Gebrauch sauber und trocken sein.
13. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien, Objektträger und Proben auf Zimmertemperatur (18-24 °C) gebracht werden.
14. Beim Arbeiten mit Proben und Reagenzien sind grundsätzlich Einmal-Latexhandschuhe zu tragen. Danach gründlich Hände waschen.
15. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien oder Proben kann das Ergebnis verfälschen.
16. Niemals mit dem Mund pipettieren und Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt mit viel Wasser und desinfizierender Seife waschen.

PROBENGEWINNUNG

Probenentnahme: Nach Möglichkeit sollten Serumproben hergestellt werden. Dazu durch Venenpunktion in ein steriles Vakuumröhrchen oder durch ein anderes geeignetes Blutentnahmesystem aseptisch ca. 5 ml

Vollblut entnehmen. Das Blut bei Zimmertemperatur (18-24 °C) gerinnen lassen. Danach muss das Serum so bald wie möglich durch Zentrifugation abgetrennt werden, um Hämolyse zu vermeiden.

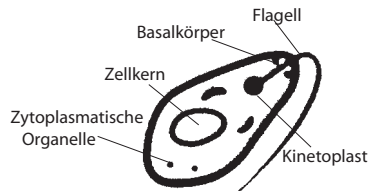
Störsubstanzen: Stark hämolytische, lipämische oder durch Mikrobenwachstum verunreinigte Seren sowie Seren von Ikteruspatienten dürfen nicht verwendet werden, weil diese Zustände zu falschen Ergebnissen führen können. Proben mit sichtbaren Verunreinigungen müssen vor Verwendung zentrifugiert werden.

Aufbewahrung: Serumproben können bei einer Temperatur von 2-10 °C maximal eine Woche lang aufbewahrt werden. Sollen die Proben länger aufbewahrt werden, müssen sie bei mindestens -20 °C eingefroren werden. Serum darf nicht in einem Kühlschrank oder Gefrierschrank mit Abtauautomatik gelagert werden.

ACHTUNG: Wiederholtes Einfrieren / Auftauen von Patientenproben ist zu vermeiden. Andernfalls können falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse auftreten.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die korrekte Interpretation der Ergebnisse hängt von der deutlichen Erkennung der verschiedenen morphologischen Merkmale des Organismus von *Crithidia luciliae* ab.



Die Außenhülle der meisten Protozoen besteht aus einer Pellikula aus Lipoprotein. Im Inneren dieser Pellikula liegt die Plasmamembran. Die Plasmamembran umgibt das Zytoplasma, bestehend aus a) der äußeren Ektoplasmaschicht mit Basalkörper und Flagellum und b) dem Endoplasma, einem innen sehr flüssigen Zytoplasma, das den Nukleus, Kinetoplast und andere Organellen enthält.

Pellikula, Plasmamembran, Basalkörper und Flagellum gelten als permanente Bestandteile des Organismus, wobei einzelne Zellen nur eine geringe Lagevariabilität aufweisen. Auch wenn der Kinetoplast im Allgemeinen näher am Basalkörper liegt als der Nukleus, kann die exakte Position dieser Organelle auf Grund der flüssigen Konsistenz des Endoplasma von Zelle zu Zelle variieren.

Um den Kinetoplast vom Nukleus klar zu unterscheiden, die positive Kontrollvertiefung ansehen. Der Kinetoplast befindet sich stets näher am Flagellum (siehe Abbildung oben). Die negative Kontrollvertiefung zeigt keine Verfärbung des Kinetoplast, die positive Kontrollvertiefung weist dagegen eine Verfärbung des Kinetoplast auf. NUR EINZELNE, GENAU DEFINIERTE ORGANISMEN IN JEDEM FELD ABLESEN. DIE MORPHOLOGIE DER EINZELNEN ORGANISMEN KANN AUF GRUND FIXIERUNG WÄHREND DES ANWACHSENS VARIIEREN.

QUALITÄTSSICHERUNG

In den für die Qualitätssicherung vorgesehenen Vertiefungen sollten Positiv-, Negativ- und PBS-Kontrollläufe durchgeführt werden. Die positive Kontrollvertiefung sollte eine helle apfelgrüne Fluoreszenz im Kinetoplast von *Crithidia luciliae* aufweisen, mit oder ohne Verfärbung des Nukleus. Die negative Kontrollvertiefung sollte keine Verfärbung des Kinetoplast zeigen.

Die PBS-Kontrollvertiefung wird zur Beobachtung nicht-spezifischer Verfärbungen durch das Antikörper-Reagens verwendet und sollte keine grüne Fluoreszenz aufweisen. Wenn die Kontrollvertiefungen nicht die beschriebenen Merkmale aufweisen, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

OPTIONALE TITRIERBARE KONTROLLE

Beim Auswerten der Titrierungen beginnen viele Labore mit der Vertiefung, die die Probe mit der größten Verdünnung enthält, und fahren mit der Auswertung „nach hinten“ zur 1:10-Verdünnung fort. Die erste Vertiefung, in der eine deutliche Verfärbung des Kinetoplast sichtbar ist, ist der Titrierungsendpunkt. Wir empfehlen diese Vorgehensweise zur Bestimmung des Titrierungsendpunkts.

In unserem Labor wurde der mittlere Titrierungsbereich (\pm eine Verdünnung nach oben oder unten, vom Mittel ausgehend) für diese Chargennummer festgelegt; dieser gilt als Richtwert. Mit Hilfe dieser Kontrolle kann

jedes Labor die Reproduzierbarkeit (Präzision) seiner nDNA-Tests selbst einschätzen. Da diese Kontrolle nicht als Indikator für die Titrierungsgenauigkeit vorgesehen ist, muss jedes Labor seinen eigenen mittleren Titrierungsendpunkt für diese Probe festlegen und sollte diese Informationen zur Bewertung der Reproduzierbarkeit (Präzision) ihrer Testläufe heranziehen.

Für jede Chargennummer wurde durch mehrere Testläufe mit dieser titrierbaren Kontrolle, unter Verwendung des nDNA-Testsystems von Immuno Concepts, ein mittlerer Titrierungswert ermittelt. Chargennummer, mittlere Titrierung und Titrierungsbereich (\pm eine Zweifach-Verdünnung nach oben oder unten, ausgehend vom Mittel) sind auf dem Etikett des Fläschchens verzeichnet und sollten zur Messung der Systemleistung herangezogen werden.

Die in unserem Labor ermittelten Werte können von Ihren eigenen Werten abweichen. Zahlreiche Faktoren können Einfluss auf Ihre Ergebnisse nehmen; hier einige Beispiele:

1. Die Art der verwendeten Lichtquelle. Quecksilber-Lichtquellen produzieren bei 495 nm mehr Erregerenergie als Quarz/Halogen. Quecksilber-Lichtquellen mit 50 Watt, 100 Watt und 200 Watt weisen bei 495 nm nur geringe Unterschiede in der Erregerenergie auf. Quarz/Halogen-Lichtquellen mit 100 Watt erzeugen bei 495 nm mehr Erregerenergie als solche mit 50 Watt.
2. Zustand und Alter der Lichtquelle. Dies gilt besonders für Quecksilber-Lichtquellen, bei denen in der Regel vor dem Durchbrennen eine allmähliche Reduzierung der Erregerenergie bei 495 nm zu beobachten ist. Dieser allmähliche Rückgang der Erregerenergie kann im Verlauf mehrerer Wochen zu einem deutlichen Sensibilitätsverlust führen. Das Problem kann durch Führen eines Lampenprotokolls vermieden werden. Für beste Ergebnisse empfiehlt es sich, 50 Watt-Quecksilberbirnen nach 100 Stunden und 100 oder 200 Watt-Quecksilberbirnen nach 200 Stunden auszuwechseln. Bei Quarz/Halogen-Lichtquellen tritt in der Regel vor dem Durchbrennen keine allmähliche Reduzierung der Erregerenergie auf.
3. Die Art des verwendeten Erregerfilters. Interferenz-Erregerfilter bieten höhere Sensibilität über eine viel schmalere Wellenlänge als Absorptions-Erregerfilter. Ziehen Sie für weitere Informationen die Gebrauchsanweisung zu Ihrem Fluoreszenz-Mikroskop zu Rate oder wenden Sie sich an den Verkäufer.
4. Korrekte Ausrichtung des Lichtwegs im Mikroskop. Dazu die Anweisungen in der Gebrauchsanweisung zu Ihrem Fluoreszenz-Mikroskop lesen.
5. Die Blendenöffnung des Objektivs. Bei Epi (Auflicht-Fluoreszenz) kann die Fluoreszenz exponential erhöht werden, da die Blendenöffnung des Objektivs additiv vergrößert wird. Auf diese Weise kann ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung mit einer Blendenöffnung von 0,65 unter Umständen ein bis zwei Verdünnungen tiefer gehen als das gleiche Objektiv mit einer Blendenöffnung von 0,85. Die Blendenöffnung ist seitlich am Objektiv aufgedruckt.
6. Unterdrückungsfilter. Mit Unterdrückungsfiltern können spezifische Erreger-Wellenlängen reduziert und zur Reduzierung der Sensibilität verwendet werden. Ziehen Sie für weitere Informationen die Gebrauchsanweisung zu Ihrem Fluoreszenz-Mikroskop zu Rate oder wenden Sie sich an den Verkäufer.
7. Präzision und Genauigkeit der Verdünnungstechnik, der Ausrüstung und der Ausführung der Testverfahren.

INTERPRETATION DER PATIENTENERGEBNISSE

Zum Betrachten der *Crithidia* wird eine 400-fache Vergrößerung empfohlen.

Negative Reaktion: Ein Serum ist als negativ für Antikörper gegen nDNA zu werten, wenn die Kinetoplast-Fluoreszenz geringer als oder gleich der negativen Kontrollvertiefung ist. Eine Verfärbung des Nukleus ohne Verfärbung des Kinetoplast ist ebenfalls als negativ für Antikörper gegen nDNA zu werten.

Positive Reaktion: Ein Serum ist als positiv zu werten, wenn der Kinetoplast eine deutlich sichtbare Verfärbung mit größerer Fluoreszenz als die negative Kontrolle aufweist.

Titrierungen: Beim Auswerten der Titrierungen beginnen viele Labore mit der Vertiefung, die die Probe mit der größten Verdünnung enthält, und fahren mit der Auswertung „nach hinten“ zur 1:10-Verdünnung fort. Die erste Vertiefung, in der eine deutliche Verfärbung des

Kinetoplast sichtbar ist, ist der Titrierungsendpunkt. Wir empfehlen diese Vorgehensweise zur Bestimmung des Titrierungsendpunkts.

FLUORESCENZ-INTENSITÄT

Die Fluoreszenz-Intensität kann semiquantifiziert werden, wenn die Richtlinien zu Fluoreszenz-Antikörperreagenzien, wie sie von den Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia (CDC) aufgestellt wurden, befolgt werden.

- 4+ brilliant gelb-grün (maximale Fluoreszenz)
- 3+ weniger brillante gelb-grüne Fluoreszenz
- 2+ klare Zellstruktur, jedoch schwache Fluoreszenz
- 1+ äußerst schwache Fluoreszenz

Zur Bestimmung der Fluoreszenz-Intensität ist ein Standard-Objekträger, FITC QC Slide™, Katalognummer 1900, von Immuno Concepts N.A., Ltd. erhältlich.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Screening: Die Ergebnisse des Tests sind als positiv oder negativ bei 1:10-Verdünnung anzugeben.

Titrierung: Die letzte Reihenverdünnung, in der eine deutliche Verfärbung des Kinetoplast sichtbar ist, ist als Ergebnis anzugeben. Ergebnisse mit einer starken Reaktion bei einer Verdünnung 1:640 sind als größer als 1:640 anzugeben.

VERFÄRBUNGSEIGENSCHAFTEN

Kinetoplast: leichte oder periphere Verfärbung des Kinetoplast in der Nähe des Flagellum-Bereichs des Organismus.

Ergebnis: positiv für Antikörper gegen nDNA.

Antigene: nDNA.

Assoziierte Erkrankung: hohe Titrierungen lassen auf aktiven SLE schließen (20), oder, falls SLE bereits früher diagnostiziert wurde, auf ein Wiederauftreten der Krankheit oder mangelhaftes Therapie-Ansprechen (21-23).

Nukleus: leichte, periphere oder gefleckte Verfärbung des Nukleus.

Ergebnis: Negativ für Antikörper gegen nDNA.

Antigene: mit dem Nukleus assoziierte Antigene (21-23).

Assoziierte Erkrankung: positive Verfärbung des Nukleus kann auf nicht-spezifische Bindegewebskrankheit schließen lassen. HINWEIS: Positive ANA-Ergebnisse mit HEp-2 oder anderen Substraten erzeugen in der Regel keine entsprechende Verfärbung des Nukleus bei *C. luciliae*. Beispielsweise erzeugt ein geflecktes ANA mit HEp-2 keine fleckige Verfärbung des Nukleus bei *C. luciliae*.

Basalkörper: leichte Verfärbung der beiden Sphären an der Verbindungsstelle des Körpers des Organismus mit dem Flagellum im Ektoplasma.

Synonyme Bezeichnung: Basallübbe.

Ergebnis: Negativ für Antikörper gegen nDNA.

Antigene: mit dem Basalkörper assoziierte Antigene. *Assoziierte Erkrankung:* wurde von SLE-Patienten berichtet, bei denen keine Verfärbung des Kinetoplast oder des Nukleus auftrat (37).

Flagellum: Verfärbung des Flagellums des Organismus. *Synonyme Bezeichnung:* Schwanzbereich des Organismus.

Ergebnis: Negativ für Antikörper gegen nDNA.

Antigene: mit dem Flagellum assoziierte unbekannte Antigene.

Assoziierte Erkrankung: nicht bekannt.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

1. Es ist nicht möglich, lediglich auf der Basis des Nachweises von nDNA-Antikörpern eine Diagnose zu stellen. Der Arzt muss die Ergebnisse im Zusammenhang mit Krankengeschichte und Symptomen des Patienten, den Ergebnissen der körperlichen Untersuchung und anderen diagnostischen Methoden interpretieren.
2. Lediglich auf Grund eines positiven Testergebnisses für anti-nDNA-Antikörper sollte keine Behandlung initiiert werden. Für eine Behandlung müssen auch klinische Symptome, andere Laborergebnisse und der Gesamteindruck des Patienten auf den behandelnden Arzt herangezogen werden.
3. Einige Medikamente, darunter Procainamid und Hydralazin, können eine Lupus erythematosus-ähnliche Erkrankung induzieren. Patienten mit Medikamenten-induziertem LE können unter Umständen positive ANA aufweisen, die in der Regel gegen nukleäre Histone gerichtet sind; es wurde aber auch über Antikörper gegen nDNA berichtet

(38-39).

4. Auch wenn ein hoch-titriertes nDNA als starkes Indiz für SLE zu sehen ist, ist der diagnostische Wert gering. Das Ergebnis sollte vielmehr in Zusammenhang mit dem klinischen Gesamtprofil des Patienten bewertet werden. Im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom, progressiver systemischer Sklerose, Dermatomyositis, diskoidem Lupus erythematosus und gemischter Bindegewebskrankheit sind oft niedrige Titrierungen von anti-nDNA vorhanden (21).
5. Wegen der zahlreichen für Fluoreszenz-Mikroskope verfügbaren Optionen empfehlen wir, bei Vergleichen von Patienten-Titrierungen zwischen verschiedenen Laboren mit standardisierten Lichtquellen, Filtern und optischen Geräten zu arbeiten.
6. Patienten, die sich einer Therapie mit Steroiden unterziehen, können negative Ergebnisse für nDNA-Antikörper aufweisen (40).

LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES TESTS

Das Immuno Concepts nDNA Testsystem wurde im Vergleich mit zwei anderen im Handel erhältlichen Fluoreszenz-Antikörpertests evaluiert (41). Im Rahmen der Studie wurden 103 Serumproben von normalen Personen untersucht sowie von Patienten mit u.a. folgenden Diagnosen: systemischer Lupus erythematosus (SLE), gemischte Bindegewebskrankheit (MCTD), Raynaud'sche progressive systemische Sklerose - CREST Variante (PSS-CREST), rheumatoide Arthritis (RA), juvenile rheumatoide Arthritis (JRA) und anderen Bindegewebskrankheiten. Die Seren wurden mit den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Screening-Verdünnungen getestet. Die Ergebnisse der Studie sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefasst:

ZU ERWARTENDE WERTE

Der zu erwartende Wert in der normalen Population ist negativ bei einer Screening-Verdünnung von 1:10. Einige Medikamente, wie etwa Hydralazin, können die Produktion von nDNA-Antikörpern induzieren (38-39).

TABELLE 1

Diagnose	Anzahl der Patienten	Immuno Concepts Positive 1:10	Hersteller A Positive 1:10	Hersteller B Positive 1:10
SLE	30	13	13	11
MCTD / Überlappung	6	0	0	0
Raynaud'sche PSS-CREST	17	0	0	0
RA	2	0	0	0
JRA	4	0	0	0
Andere gemischte Bindegewebskrankheit	9	0	0	0
Hospitalisierte Kontrollen	11	1	1	1
Normale Kontrollen	24	0	0	0

Die hospitalisierten Kontrollen, die bei allen *Crithidia luciliae* nDNA Tests positiv waren, hatten Immunkomplex-Nierenkrankung, welche die Kriterien für eine Diagnose von SLE nicht erfüllten.

nDNA-FLUORESCENZ-TESTVERFAHREN

- 1. PUFFER (PBS) REKONSTITUIEREN**
Inhalt eines Beutels mit PBS-Pufferpulver in einem Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Die PBS-Waschpufferlösung kann verschlossen und gekühlt bei 2-10 °C bis zu vier Wochen aufbewahrt werden.
- 2. Patientenproben verdünnen**
Screening: Patientenproben 1:10 verdünnen, indem 0,1 ml (100 µl) Serum zu 0,9 ml rekonstituiertem PBS zugegeben werden. Semiquantitative Titrierung: Zur Herstellung von zweifachen Reihenverdünnungen der Screening-Proben (z.B. 1:20, 1:40, 1:80...1:640), 0,5 ml von der 1:10 Verdünnung trennen und mit 0,5 ml PBS mischen, um eine Verdünnung von 1:20 zu erzielen, anschließend auf diese Weise weitere Verdünnungen herstellen.
- 3. VERDÜNNEN DES OPTIONALEN TITRIERBAREN KONTROLLSERUMS**
Die optionale titrierbare Kontrolle als unverdünnte Patientenprobe behandeln. Das Kontrollserum 1:10 verdünnen, indem 0,1 ml (100 µl) Kontrollserum zu 0,9 ml rekonstituiertem PBS zugegeben werden. Zweifache Reihenverdünnungen des titrierbaren Kontrollserums wie oben beschrieben herstellen.
- 4. SUBSTRATRÄGER VORBEREITEN (20-25 µl/Vertiefung)**
Objekträger aus der Folie entnehmen und Kontrollseren wie folgt in den Kontrollvertiefungen platzieren: Tropfflasche mit Kontrollserum umdrehen und vorsichtig drücken, bis an der Spitze ein Tropfen austritt. Den Tropfen vorsichtig in die entsprechende Kontrollvertiefung geben, dabei direkten Kontakt der Tropferspitze mit der Oberfläche des Objekträgers vermeiden. Das positive Kontrollserum in die mit "+" markierte Vertiefung, das negative Kontrollserum in die mit "-" markierte Vertiefung und einen Tropfen PBS-Puffer in die mit "PBS" markierte Vertiefung geben. 1 Tropfen (20-25 µl) Patientenprobe in die nummerierten Vertiefungen geben.
ACHTUNG: DIREKTER KONTAKT DER TROPFERSPITZE MIT DEM OBJEKTRÄGER KANN DAS ANTIGEN-SUBSTRAT BESCHÄDIGEN.
- 5. OBJEKTRÄGER INKUBIEREN (30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur, 18-24 °C)**
Objekträger in eine feuchte, bedeckte Schale legen (z. B. Petrischale mit angefeuchtetem Papierhandtuch). 30 Minuten (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur (18-24 °C) abgedeckt inkubieren lassen.
- 6. PBS-SPÜLUNG**
Objekträger aus der Inkubationsschale nehmen und mit Spritzflasche, Pasteur- oder serologischer Pipette kurz mit PBS spülen. Den Puffer nicht direkt in die Vertiefungen einspritzen.
HINWEIS: Um bei Objekträgern mit 13 Vertiefungen eine Kreuzkontamination zu vermeiden, den PBS auf die Mittellinie des Objekträgers spritzen, dabei den Träger zuerst in Richtung Vertiefungen 1-5 neigen, anschließend in Richtung Vertiefungen 6-10.
- 7. PBS-WASCHVORGANG (10 Minuten)**
Objekträger in einem entsprechenden Gefäß 10 Minuten mit PBS waschen (Glaszylinder, Schale). Beim Eintauchen, in der Mitte des Waschvorgangs und beim Herausnehmen leicht hin- und herbewegen. Der Waschvorgang kann ohne Auswirkung auf die Testergebnisse auf 10-30 Minuten ausgedehnt werden. PBS-Waschlösung nach Gebrauch entsorgen. Für optimale Ergebnisse sollte nach Ablauf der halben Waschzeit der PBS-Waschpuffer gewechselt und ein magnetischer Rührer verwendet werden.
- 8. FLUORESCENZ-ANTIKÖRPERREAGENS (Vertiefungen mit 10-12 Tropfen befüllen)**
Jeweils einen Objekträger aus dem PBS-Puffer nehmen und 3-5 Mal in deionisiertes oder destilliertes Wasser tauchen. Überschüssiges Wasser durch Ausklappen auf Saugpapier oder Papierhandtuch entfernen. Objekträger sofort wieder in die Inkubationskammer geben und die Vertiefungen vollständig mit Fluoreszenz-Antikörperreagens füllen; beginnend mit einem Tropfen pro Vertiefung. Vorgang für alle Objekträger wiederholen. Das Fluoreszenz-Antikörperreagens wurde titriert, um für auf dem Objekträger verbliebenes deionisiertes oder destilliertes Wasser zu kompensieren.
HINWEIS: Es ist wichtig, dass die Vertiefungen auf dem Objekträger während dieses Vorgangs nicht austrocknen, andernfalls kann das Substrat beschädigt werden. **DEN OBJEKTRÄGER NICHT TROCKEN TUPFEN ODER WISCHEN, ODER LÄNGER ALS 15 SEKUNDEN OHNE FLUORESCENZ-ANTIKÖRPERREAGENS STEHEN LASSEN.**
- 9. OBJEKTRÄGER INKUBIEREN (30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur, 18-24 °C)**
Deckel auf Inkubationskammer setzen und mit Papierhandtuch abdecken, um das Eindringen von Licht zu vermeiden, falls die Kammer durchsichtig ist. Objekträger 30 Minuten (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur (18-24 °C) inkubieren lassen.
- 10. PBS-SPÜLUNG**
Objekträger aus der Inkubationsschale nehmen und kurz mit PBS spülen. Den Puffer nicht direkt in die Vertiefungen einspritzen.
- 11. PBS-WASCHVORGANG (10 Minuten)**
Objekträger in einem entsprechenden Gefäß 10 Minuten mit PBS waschen (Glaszylinder, Schale). Beim Eintauchen, in der Mitte des Waschvorgangs und beim Herausnehmen leicht hin- und herbewegen. Der Waschvorgang kann ohne Auswirkung auf die Testergebnisse auf 10-30 Minuten ausgedehnt werden.
- 12. DECKGLAS AUFSETZEN**
Jeweils einen Objekträger aus dem PBS-Puffer nehmen und 3-5 Mal in deionisiertes oder destilliertes Wasser tauchen. Überschüssiges Wasser durch Ausklappen auf Saugpapier oder Papierhandtuch entfernen.
DEN OBJEKTRÄGER NICHT TROCKEN TUPFEN ODER WISCHEN, ODER LÄNGER ALS 15 SEKUNDEN OHNE DECKGLAS STEHEN LASSEN. 4-5 Tropfen semipermanentes Eindeckmedium entlang der Mittellinie jedes Objekträgers hinzugeben. Deckglas vorsichtig in Position bringen; dabei Luftschlüsse vermeiden; hierzu das Deckglas vorsichtig an einem Ende des Objekträgers aufsetzen und auf das andere Ende herablassen.
HINWEIS: Überschüssiges Montagemedium auf dem Objekträger kann wegen der Lichtstreuung oder wegen ungenügender Auflösung der Zellen (verschwommenes Bild) zu einem hohen Fluoreszenz-Hintergrund führen. Überschüssiges Montagemedium kann vom Objekträger entfernt werden, indem das Deckglas mit Saugpapier abgetupft wird, ohne es dabei zu bewegen.

TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG: +916-363-2649
oder via E-Mail:
techservice@immunoconcepts.com

FLUORESCERANDE NDNA TESTSYSTEM FÖR DIAGNOSTISK ANVÄNDNING IN VITRO

AVSEDD ANVÄNDNING: Detta är ett indirekt fluorescerande antikroppstest för halvkvantitativ detektion av anti-nDNA antikropp i humanserum. Detta testsystem skall användas som ett hjälpmedel vid diagnostisering av systemisk lupus erytematosus.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET

Antinukleär antikropp (ANA) är en allmän term som används för att beskriva autoantikroppar mot olika cellnukleära proteiner. Tidiga studier av dessa autoantikroppar med hjälp av immunofluorescerande teknik uppvisar ett litet antal nukleärprotein-specifitet (1). Tack vare det höga sambandet mellan positiv ANA med systemisk lupus erytematosus (SLE) utesluter negativ ANA i huvudsak sjukdomen (2).

Även om DNA-specifika antikroppar fortfarande har ett högt sjukdomssamband med SLE (3), har under senare år ett antal nukleära (4) och cytoplasmiska (5-7) makromolekyler upptäckts och associerats med andra bindvävsjukdomar (8-10). Eftersom vissa av dessa antikroppar ser ut att kunna användas i diagnostiskt och/eller prognostiskt syfte vid progressiv systemisk skleros (11-12), blandad bindvävsjukdom (13-15), Sjögrens syndrom (16-17), polymyosit (18) och reumatoid artrit (19), har ANA-testning nu erkänts som ett allmänt screeningredskap för bindvävsjukdom (20).

SLE-patienter kan producera antikroppar mot flera olika nukleära antigener, men antikroppar som är riktade mot Sm (Smith-antigen) och nDNA uppvisar det högsta sambandet med sjukdomen (20). Antikroppar riktade mot Sm uppvisar ett fläckigt ANA-färgningsmönster, medan antikroppar riktade mot nDNA i allmänhet uppvisar ett homogent ANA-färgningsmönster. Även om patienter med reumatoid artrit, Sjögrens sjukdom, progressiv systemisk skleros, dermatomyosit, skivformig lupus erytematosus och blandad bindvävsjukdom (21) kan ha låga nDNA-antikroppnivåer, är höga nDNA-antikroppnivåer så gott som uteslutande fallet vid SLE. Antikroppar mot nDNA tros ha ett samband med patogenesen vid de flesta svåra varianter av SLE, när dessa avsätter sig som immunkomplex (22). Antikroppar mot nDNA förekommer i höga antikroppnivåer, och eftersom de är associerade med sjukdomens aktivitet (23) är det viktigt att de upptäcks för behandlingen av SLE-patienterna.

Flera analyser finns tillgängliga för detektion av nDNA-antikroppar. Följande metoder används mest: Indirekt immunfluorescens, radioimmunanalys, kontrainmunelektrofores samt immundiffusion (24-27). Immuno Concepts nDNA-testsystem är en indirekt fluorescerande antikropp (IFA)-metod. Serumantikropp, reaktiv mot nDNA, detekteras genom färgning av kinetoplasten inuti organismen *Criethidia luciliae* (34). *C. luciliae* är en parasit på sphyflugan och inte patogen för människor. Dessa hemoflagellaters kinetoplast är en del av den stora mitokondrie, i vilken det spiralformade nDNA:et är koncentrerat (33-34). På elektronmikrografier syns kinetoplasten som en något konvax skivformad struktur innehållande mitokondriskrista och en fibrös DNA-massa (35). Kinetoplasten är belägen mellan den centralt placerade kärnan och flagellens basala knut. Eftersom kinetoplast-nDNA inte innehåller några enbriga DNA (ssDNA)-smittämnen, går det praktiskt taget att utesluta eventuella problem med falskt positiva reaktioner på ssDNA, vilket kan förekomma med DNA-radioimmunanalys på kalvbross (28-33).

TESTPRINCIP

Immuno Concepts nDNA-test använder den indirekta fluorescerande antikropptechnik som först beskrivits av Weller och Coons (36). Patientprov odlas med antigen-substrat för att tillåta specifik bindning av autoantikroppar till kinetoplast-nDNA. Om det förekommer nDNA-antikroppar bildas ett stabilt antigen/antikroppkomplex. Efter tvättning för att avlägsna ospecifika antikroppar odlas substratet med en antihuman antikroppreagens konjugerat med fluoroscein. Om resultatet är positivt bildas ett stabilt komplex i tre delar bestående av en fluorescerande antikropp bunden till en human anti-nDNA-antikropp, som i sin tur är bunden till en nDNA-antigen. Detta komplex kan studeras i ett fluorescerande mikroskop. I positiva prover uppvisar kinetoplasten eller kinetoplasten och kärnan en klar äp- pelgrön fluorescens inuti organismerna *Criethidia luciliae*. Om provet är nDNA-negativt uppvisar kinetoplasten ingen fluorescens.

SYSTEMKOMPONENTER (MATERIAL SOM MEDFÖLJER)

Användning: Alla komponenter levereras bruksfärdiga utan krav på delning eller rekonstitution (förutom PBS-bufferten som måste lösas upp i avjoniserat eller destillerat vatten före användning).

Förvaring: Alla komponenter kan kylförvaras i 2-10 °C. Efter rekonstitution skall PBS-bufferten förvaras i skruvlockbehållare under kylning i 2-10 °C.

Stabilitet: Alla komponenter är stabila i minst tolv månader från tillverkningsdatum. Använd ingen komponent efter dess utgångsdatum.

REAKTIVA REAGENSER

Objektglas för substrat: *Katalognr 3007 (sjubrunnars), 3013 (trettonbrunnars). Sju- eller trettonbrunnars nDNA-substratobjektglas med *Criethidia luciliae* stabiliserade direkt på testbrunnarna. Ett unikt vallgravsformat objektglas minimerar korskontamination mellan brunnarna under analysen. Objektglaset innehåller kontrollbrunnar som är positivt eller negativt betecknade samt PBS för att underlätta korrekt tolkning av resultat.

Positiv kontroll: Katalognr 3021. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml positivt humankontrollserum med antikropp specifik för nDNA-antigener. Detta serum uppvisar en ljus positiv färgningsreaktion på kinetoplasten på Immuno Concepts *Criethidia luciliae*-substrat. Denna reagens innehåller 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel.

Titrerbar kontrollserum: Katalognr 3026: Bruksfärdig ampull innehållande 1,0 ml positivt humankontrollserum som skall behandlas som ett outspätt patientprov. Denna reagens innehåller 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel. Se ampullens etikett för uppgift om antikroppnivå.

Negativt kontrollserum: Katalognr 3031. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml negativt humankontrollserum. Det negativa kontrollserumet uppvisar ingen specifik färgning av kinetoplasten i Immuno Concepts *Criethidia luciliae*-substrat. Denna reagens innehåller 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel.

Fluorescerande antikroppreagens: Katalognr 3009 (9,0 ml), 3075 (23 ml). Getantihuman IgG (tung och lätt kedjor) konjugerade med fluorescein isotiocyanat (FITC). Reagensen levereras bruksfärdig i precisionspipettflaskor med 9,0 ml för vart tionde objektglas i kompletta testsatser. Denna reagens innehåller 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel.

**Detta objektglas är skyddat genom ett eller flera av följande amerikanska eller utländska patent: 4387972, D-274261, D-273261, kanadensiskt patent 1171302 och övriga inplanerade patent.*

ICKE-REAKTIVA REAGENSER

PBS buffertpulver: Katalognr 1011. Fosfatbuffrat saltlösningpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Varje påse innehåller tillräckligt med buffertpulver för att ge 1 liter. (En påse med buffertpulver levereras för vart femte objektglas i kompletta testsatser).

Framställning: Sönderdela en påse buffertpulver i 1 liter avjoniserat eller destillerat vatten, täck och förvara avkylt i 2-10 °C i upp till fyra veckor, eller tills det syns tecken på kontamination eller andra synliga förändringar.

Halvpermanent monteringsmedium: Katalognr 1111. Bruksfärdig pipettampull innehållande 5,0 ml glycerolbaserat monteringsmedium, pH 9,1 ± 0,2. Denna reagens innehåller 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel.

Skyddsremсор: Katalognr 1041. Varje bunt innehåller tio 24 x 60 mm skyddsremсор nr 1 av glas.

YTTERLIGARE MATERIAL SOM BEHÖVS (MEDFÖLJER EJ)

Volymetriska pipetter för pipettering av 20-25 µl
volymer
Coplin-kärl eller färgningsskålar
Klämflaska eller Pasteur-pipetter
Serologiska pipetter
Avjoniserat eller destillerat vatten
Provrör för att framställa serumspädningar
Läskpapper eller pappershanddukar
Engångshandskar av latex

Enliters skruvlockbehållare (för PBS-buffert)
Laboratorietidur
Fluorescerande mikroskop med 495 nm matarfilter
och 515 nm spärrfilter.

FÖRSIKTIGHET

- Allt material av humant ursprung som använts för att förbereda kontroller för denna produkt har testats med en FDA-godkänd metod och visat sig vara negativt (inte upprepat reaktivt) för antikroppar mot humant immunbristvirus-1, humant immunbristvirus-2 (HIV-1 och HIV-2), hepatit C-virus (HCV) samt hepatit B ytantigen (HBsAg). Ingen testmetod kan helt och hållet garantera att det inte förekommer HIV-1, HIV-2, hepatit C-virus, hepatit B-virus eller andra smittämnen. Därför skall all kontrollera hanteras som potentiellt smittsamt material.
- Alla patientprover på biosäkerhetsnivå 2 skall hanteras enligt rekommendationerna för eventuellt smittsamt humanserum eller blodprov i manualen från Centrum för Sjukdomskontroll/Nationella hälsoinstitut: Biosäkerhet i mikrobiologiska och biomedicinska laboratorier, 1984 års upplaga.
- Spädning av komponenter eller byte till andra komponenter än de som medföljer detta system kan ge motsäggande resultat.
- Natriumazid (0,1 %) används som konserveringsmedel. Natriumazid kan reagera med bly- eller kopparledningar och bilda explosiva metallazidsalter. När reagenser kasseras skall man därför spola med stora mängder kravatten för att avlägsna eventuella rester i rörsystemen. Natriumazid är ett gift och kan vara toxiskt vid förtäring.
- Denna sats är avsedd för diagnostisk användning *in vitro*.
- Om hemolyserat eller lipemiskt sera måste användas, skall inaktivt sera värmas i 30 minuter i 56 °C för att uppnå optimala resultat. Mikrobiellt kontaminerat sera skall inte användas.
- Det titrerbara kontrollserumet är avsett att användas för att övervaka reproducerbarheten mellan olika loter eller serier. Det är inte avsett för mätning av den totala sensitiviteten eller analysens specificitet.
- Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prover eller satsreagenser hanteras.
- Undvik alltid stänk eller alstring av aerosoler.
- Andra inkubationstider och temperaturer än de angivna kan orsaka felaktiga resultat.
- Korskontamination mellan reagenser eller prover kan ge felaktiga resultat.
- Återanvändningsbart glas måste tvättas och noggrant sköljas från rengöringsmedel före användning. Allt glas måste rengöras och torkas före användning.
- Placera alla reagenser, objektglas och prov i rumstemperatur (18-24 °C) före användning.
- Använd engångshandskar av latex vid hantering av prover och reagenser, och tvätta händerna noggrant efteråt.
- Mikrobisk kontamination av reagenser eller prov kan ge felaktiga resultat.
- Pipettera aldrig med munnen och undvik att komma i kontakt med reagenser och prov med hud eller slemhinnor. Tvätta med bakteriedödande tvål och rikligt med vatten om kontakt ändå inträffat.

PROVTAGNING

Provtagning: Serum rekommenderas som prov. Cirka 5 ml helblod skall tas aseptiskt genom venpunktion med hjälp av ett sterilt vakuumbloodtagningsrör eller annat lämpligt blodtagningssystem. Låt blodet koagulera i rumstemperatur (18-24° C). Serum skall så snart som möjligt separeras från koagler genom centrifugering för att minimera hemolys.

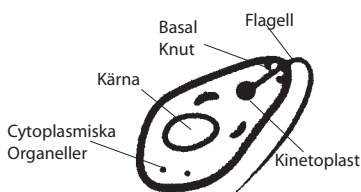
Störande substanser: Sera som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus, lipemi, eller mikrobiell tillväxt bör inte användas, eftersom dessa betingelser kan leda till felaktiga resultat. Prover som innehåller synliga partiklar bör klargöras genom centrifugering före testning.

Förvaring: Sera kan förvaras i 2-10 °C under högst en vecka. Om analysen fördröjs ytterligare skall sera frysas i -20 °C eller lägre. Serum bör inte förvaras i självavfrostande kylskåp eller fryslagerum.

VARNING: Upprepad frysning/upptining av patientprover kan ge felaktigt positiva eller negativa resultat.

TOLKNING AV RESULTAT

Korrekt tolkning av resultatet beror på om det var enkelt att känna igen *Crithidia luciliae*-organismens olika morfologiska kännetecken.



Det yttre höjlet på de flesta protozoer består av en tunn hinna av lipoprotein. Plasmamembranet ligger inuti denna tunna hinna. Plasmamembranet omsluter cytoplasman bestående av a) ett yttre ektoplasmlager som omfattar basal knut och flagell och b) endoplasman, en mycket flytande inre cytoplasma som omfattar kärnan, kinetoplasten och andra organeller.

Den tunna hinnan, plasmamembranet, den basala knuten och flagellen ses i allmänhet som fasta fixurer inuti organismen, med liten variabilitet i placering från cell till cell. Även om kinetoplasten i allmänhet är belägen närmare den basala knuten än kärnan, kan den exakta placeringen av denna organell variera från cell till cell beroende på endoplasmans flytande konsistens.

Granska den positiva kontrollbrunnen för att klart särskilja kinetoplasten från kärnan. Kinetoplasten är alltid belägen närmare flagellen (se bild ovan). Till skillnad från den positiva kontrollen uppvisar den negativa kontrollbrunnen ingen kinetoplastfärgning. STUDERA ENDAST ENSKILDA, VÄLDEFINIERADE ORGANISMER INOM VARJE FÄLT. MORFOLOGIN KAN VARIERA FRÅN ORGANISM TILL ORGANISM PÅ GRUND AV FIXERING UNDER LOGGFASENS GRADVISA TILLVÄXT.

KVALITETSKONTROLL

Positiva, negativa och PBS-kontroller bör köras i de brunnar som tillhandahålls för kvalitetskontroll på varje objektglas. Den positiva kontrollen skall uppvisa ljus äppelgrön fluorescens i *Crithidia luciliae*-kinetoplasten, med eller utan färgning av kärnan. Den negativa kontrollen uppvisar ingen färgning av kinetoplasten. PBS-kontrollen används för att observera ospecifik färgning av antikroppreagensen och bör inte uppvisa någon grön fluorescens. Om kontrollerna inte ser ut enligt beskrivningarna är testet ogiltigt och bör göras om.

TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL

Vid avläsning av antikroppnivåer börjar många laboratorier med att läsa den brunn som innehåller det mest spädda provet och läser "baklänges" till spädningen 1:10. Den första brunnen med klart urskiljbar kinetoplastfärgning är antikroppnivåns ändpunkt. Vi rekommenderar denna teknik för att fastställa antikroppsnivåns ändpunkter.

Det medelvärde och spridningsområde för antikroppnivån (\pm en spädning på var sin sida om medelvärdet) som bestämts för detta lotnummer har fastställts i vårt laboratorium och uppges som vägledning. Denna kontroll tillhandahålls för att varje laboratorium skall ha tillgång till nDNA-testningens reproducerbarhet (precision). Eftersom kontrollen inte är avsedd att vara en indikator på antikroppnivåns precision, bör varje laboratorium etablera sitt eget medelvärde för antikroppnivåns ändpunkt för provet i fråga och använda denna information för att få tillgång till reproducerbarheten (precisionen) mellan olika serier.

Genom upprepade analyser av denna titrerbara kontroll med användande av Immuno Concepts fluorescerande nDNA-testsystem har ett medelantikroppvärde etablerats för varje lotnummer. Lotnumret, medelvärdet och spridningsområdet för antikroppnivån (\pm en dubbel spädning på vardera sidan om medelvärdet) finns angivet på ampullens etikett, och bör användas som vägledning för testsystemets prestanda.

De värden som erhålls i vårt laboratorium kan skilja sig från era. Några av de många faktorer som kan inverka på resultaten kan omfatta, men är inte begränsade till:

- Vilken typ av ljuskälla som används. Ljuskällor av kvicksilver ger högre exciteringsenergi vid 495 nm än kvarts/halogen. Ljuskällor av kvicksilver på 50 watt, 100 watt och 200 watt skiljer sig något i exciteringsenergi vid 495 nm. Kvarts-/halogenljuskällor på 100 watt ger högre exciteringsenergi vid 495 nm än kvarts-/halogenljuskällor på 50 watt.
- Ljuskällans skick och ålder. Detta gäller framför allt för ljuskällor av kvicksilver, som i allmänhet uppvisar en gradvis minskning i exciteringsenergi vid 495 nm, innan de smälter ned. Denna gradvisa minskning i exciteringsenergi kan leda till en avsevärd förlust i känslighet över flera veckors tid. Detta problem

kan undvikas genom att man för en fidsloggbok. För bästa resultat: Byt ut 50 watts glödlampor av kvicksilver efter 100 timmar och 100 eller 200 watts glödlampor av kvicksilver efter 200 timmar. Kvarts-/hologenljuskällor uppvisar i allmänhet ingen gradvis minskning i exciteringsenergi, innan de smälter ned.

3. Vilken typ av matarfilter som används. Störningsmatarfilter ger större känslighet över en mycket smalare våglängd än absorptionsmatarfilter. Se bruksanvisningen till det fluorescerande mikroskopet eller kontakta säljaren för mer information.
4. Korrekt justering mikroskopets ljusbana. Se bruksanvisningen till det fluorescerande mikroskopet för mer information.
5. Objektivets numeriska bländaröppning. Med infallande ljusfluorescens (Epi) ökar fluorescensen exponentiellt, medan den numeriska bländaröppningen (NA) ökar additivt. Detta kan göra att ett 40X-objektiv med en NA på 0,65 läser en eller flera spädningar lägre än ett 40X-objektiv med en NA på 0,85. Den numeriska bländaröppningen står angiven på sidan av objektivet.
6. Spärffilter. Spärffiltret minskar de speciella exciteringsvåglängderna och kan användas för att minska känsligheten. Se bruksanvisningen till det fluorescerande mikroskopet eller kontakta säljaren för mer information.
7. Precision och exakthet i spädningsteknik, utrustning och testmetodernas utförande.

TOLKNING AV PATIENTRESULTAT

400 gångers total förstoring rekommenderas för att studera Chritidid.

Negativt: Ett serum betraktas som negativt för antikroppar mot nDNA om kinetoplastfluorescensen är mindre än eller lika med den negativa kontrollbrunnen. Nukleär färgning, utan kinetoplastfärgning, betraktas också som negativt för antikroppar mot nDNA.

Positivt: Ett serum betraktas som positivt, om kinetoplasten uppvisar en klart urskiljbar färgning med en fluorescens större än den negativa kontrollbrunnen.

Antikroppnivåer: Vid avläsning av antikroppnivåer börjar många laboratorier med att läsa den brunn som innehåller det mest spädda provet och läser "baklänges" till spädningen 1:10. Den första brunnen med klart urskiljbar kinetoplastfärgning är antikroppnivåns ändpunkt. Vi rekommenderar denna teknik för att fastställa antikroppnivåns ändpunkter.

FLUORESCENSENS INTENSITET

Fluorescensens intensitet kan semikvantifieras enligt de riktlinjer för fluorescerande antikroppreagenser som Centralerna för kontroll och förebyggande av sjukdom, Atlanta, Georgia, USA (CDC) har upprättat.

- 4+ Lysande gulgrön (maximal fluorescens)
- 3+ Mindre lysande gulgrön fluorescens
- 2+ Avgrensat cellmönster, men svag fluorescens
- 1+ Mycket dämpad fluorescens

Ett standardobjektglas för fastställande av dessa fluorescerande intensiteter, FITC QC Slide™, katalognummer 1900, kan beställas från Immuno Concepts N.A., Ltd.

RESULTATRAPPORTERING

Screening: Resultatet skall rapporteras som positiva eller negativa vid spädning 1:10.

Bestämning av antikroppnivå: Resultatet skall rapporteras som den sista seriespädningen med klart urskiljbar färgning av kinetoplasten. Resultat med en stark reaktion vid spädning 1:640 skall rapporteras som större än 1:640.

FÄRGNINGSKARAKTÄRISTIK

Kinetoplast: En jämn eller perifer färgning av den kinetoplast som finns i närheten av organismens flagellära område.

Resultat: Positiv för antikroppar mot nDNA.

Antigener: nDNA.

Sjukdomssamband: Höga antikroppnivåer tyder på aktiv SLE (20), eller vid tidigare diagnostiserad SLE, återkommande sjukdom eller bristande respons på behandling (21-23).

Kärna: En jämn, perifer, eller fläckig färgning av kärnan.

Resultat: Negativ för antikroppar mot nDNA.

Antigener: Nukleärassocierade antigener (21-23).

Sjukdomssamband: Positiv nukleär färgning kan tyda

på specifik bindvävssjukdom.

OBSERVERA: Positiva ANA-resultat som erhållits genom HEp-2 eller andra substrat ger normalt inte motsvarande nukleära färgning på *C. Luciliae*. Till exempel bevisar inte en fläckig ANA genom HEp-2 nukleär färgning på *C. Luciliae*.

Basala knutar: En jämn färgning av de båda områden som är belägna där organismknuten ansluter till flagellen i ektoplasman.

Synonymer: Basala fötter.

Resultat: Negativ för antikroppar mot nDNA.

Antigener: Antigener associerade med basal knut.

Sjukdomssamband: Rapporterade hos SLE-patienter som inte uppvisar någon kinetoplast- eller nukleär färgning (37).

Flagell: Färgning av organismens flagell.

Synonymer: Organismens svansområde.

Resultat: Negativ för antikroppar mot nDNA.

Antigener: Okända flagellassocierade antigener.

Sjukdomssamband: Okänt.

TESTETS BEGRÄNSNINGAR

1. Diagnos kan inte ställas enbart på grundval av defektion av anti nDNA-antikropp. Läkaren måste tolka dessa resultat med hänsyn till patientens historia och symptom, de fysiska upptäckterna och övriga diagnostiska metoder.
2. Behandling bör inte påbörjas enbart på grundval av ett positivt test för anti nDNA-antikroppar. Kliniska symptom, andra laboratorieupptäckter och läkarens kliniska intryck måste beaktas innan behandling påbörjas.
3. Vissa läkemedel, inklusive procainamid och hydralazin, kan orsaka en lupus erytematosus-liknande sjukdom. Patienter med läkemedelsinducerad LE kan uppvisa positiva antinukleära antikroppar, vilka i allmänhet är riktade mot nukleära histoner, även om antikropp till nDNA också har rapporterats (38-39).
4. Även om en högt titrerad nDNA i hög grad kan tyda på SLE, bör detta inte betraktas diagnostiskt, utan snarare ses som en del av patientens totala sjukdomshistoria. Låga nDNA-antikroppnivåer är ofta fallet med sera hos patienter med reumatoid artrit, Sjögrens syndrom, progressiv systemisk skleros, dermatomyosit, skivformig lupus erytematosus och blandad bindvävssjukdom (21).
5. Eftersom det finns många olika alternativ att tillgå vad gäller fluorescerande mikroskop, rekommenderas att ljuskällor, filter och optik standardiseras, när man jämför patienters antikroppnivåer mellan laboratorier.
6. Patienter under steroidbehandling kan uppvisa negativa resultat för nDNA-antikropp (40).

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Det förväntade värdet i den normala populationen är negativt i screeningspädning 1:10. Vissa läkemedel, t ex hydralazin, kan medföra produktion av nDNA-antikroppar (38-39).

PRESTANDA

Immuno Concepts nDNA-testsystem utvärderades genom jämförelse med två andra kommersiellt tillgängliga fluorescerande antikroppstester (41). Studien omfattade 103 serumprover från normala individer samt patienter med diagnoser som omfattade systemisk lupus erytematosus (SLE), blandad bindvävssjukdom (MCTD), Raynauds progressiva systemisk skleros-CREST-variant (PSS-CREST), reumatoid artrit (RA), reumatoid artrit hos barn (JRA) och andra bindvävssjukdomar. Sera testades vid de screeningspädningar som respektive tillverkare rekommenderade. Studieresultatet sammanfattas i följande tabell.

TABELL 1

Diagnos	Antal patienter	Immuno Concepts Positiva 1:10	Tillverkare A Positiva 1:10	Tillverkare B Positiva 1:10
SLE	30	13	13	11
MCTD / överlappning	6	0	0	0
Raynaud's PSS-CREST	17	0	0	0
RA	2	0	0	0
JRA	4	0	0	0
Annan bindvävssjukdom	9	0	0	0
Sjukhuskontroller	11	1	1	1
Normala kontroller	24	0	0	0

Den sjukhuskontroll som var positiv i alla *Crithidia luciliae* nDNA-tester uppvisade immunkomplex njursjukdom som inte motsvarade kriteriet för SLE-diagnos.

FLUORESCERANDE nDNA TESTMETOD

- REKONSTITUTION AV BUFFERT (PBS)**

Lös upp innehållet i en buffertpåse i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. PBS-bufferten kan täckas och förvaras i 2-10° C i maximalt fyra veckor.
- SPÄDNING AV PATIENTPROV**

Screening: Späd patientprovet till 1:10 genom att tillsätta 0,1 ml (100 µl) serum till 0,9 ml rekonstituerad PBS. Semikvantitativ bestämning av antikroppnivå: För att framställa dubbla seriespädningar av screeningprov (t ex 1:20, 1:40, 1:80...1:640), avlägsna 0,5 ml av spädningen 1:10 och blanda med 0,5 ml av PBS för att uppnå spädningen 1:20. Fortsätt därefter med seriespädningarna på detta sätt.
- SPÄDNING AV TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL**

Behandla den tillhörande titrerbara kontrollen som ett ospädd patientprov. Späd kontrollen 1:10 genom att tillsätta 0,1 ml (100 µl) kontrollserum i 0,9 ml rekonstituerad PBS. Framställ dubbla spädningar av den titrerbara kontrollen (se skiss ovan).
- ORDNINGSTÄLLANDE AV OBJEKTGLAS FÖR SUBSTRAT (20-25 µl/brunn)**

Avlägsna objektglaset/objektglaset från påsen/påsarna och placera kontrollsera på kontrollserabrunnarna enligt följande: Vänd upp och ned på pipettflaskan och kläm försiktigt tills det syns en droppe på spetsen. För försiktigt droppen till rätt kontrollbrunn, men undvik direktkontakt mellan pipettspetsen och objektglasets yta. Placera den positiva kontrollen på den brunn som är markerad "+", den negativa kontrollen på den brunn som är markerad "-." och en droppe PBS-buffert på den brunn som är markerad "PBS". Tillsätt 1 droppe (20-25 µl) patientprov i de nummerade brunnarna. VARNING: DIREKTCONTACT MELLAN PIPETTSPETSEN OCH OBJEKTGLASETS YTA KAN LEDA TILL ATT ANTIGENSUBSTRATET TAR SKADA.
- ODLING AV OBJEKTGLAS (30±5 minuter i rumstemperatur, dvs 18-24 °C)**

Placera objektglaset/-n i en fuktig täckt kammare (en petriskål med fuktad pappershandduk duger). Odlas, med locket på, i 30 minuter (±5 minuter) i rumstemperatur (18-24 °C).
- PBS-SKÖLJNING**

Avlägsna objektglaset/-n från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS genom att använda en sprutflaska, Pasteur, eller serologisk pipett. Spruta inte buffert direkt på brunnarna. OBSERVERA: Led PBS-flödet längs objektglasets mittlinje för att undvika korskontamination på trettonbrunnars objektglas genom att först luta glaset mot brunnarna 1-5 och därefter mot brunnarna 6-10.
- PBS-TVÄTTNING (tio minuter)**

Tvätta objektglaset/-n under tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Försiktig omskakning rekommenderas vid nedsänkningen av objektglaset, vid mittpunkten samt vid avlägsnandet. Denna tvättning kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas. Kassera PBS-tvättlösningen efter användning. För optimala resultat skall PBS ändras vid mittpunkten och en magnetisk blandare användas.
- FLUORESCERANDE ANTIKROPPREAGENS (täck brunnarna med 10-12 droppar)**

Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten. Knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. Återför omedelbart objektglaset till inkubationskammaren och täck brunnarna helt med fluorescerande antikroppreagens. Börja med att placera en droppe i varje brunn.
- Upprepa detta för varje objektglas. Den fluorescerande antikroppreagens har titrerats för att kompensera för det avjoniserade eller destillerade vatten som finns kvar på objektglaset efter sköljning. OBSERVERA: Det är viktigt att objektglasbrunnarna inte torkar under detta förfarande, annars tar substratet skada. TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN FLUORESCERANDE ANTIKROPPREAGENS LÄNGRE ÄN FEMTON SEKUNDER.
- ODLING AV OBJEKTGLAS (30±5 minuter i rumstemperatur, dvs 18-24 °C)**

Placera locket på inkubationskammaren och täck med en pappershandduk för att förhindra att det utsätts för ljus, om kammaren inte är ogenomskinlig. Odlas objektglaset/-n i 30 minuter (±5 minuter) i rumstemperatur (18-24 °C).
- PBS-SKÖLJNING**

Avlägsna objektglaset/-n från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.
- PBS-TVÄTTNING (tio minuter)**

Tvätta objektglaset/-n i tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Försiktig omskakning rekommenderas vid nedsänkningen av objektglaset, vid mittpunkten samt vid avlägsnandet. Denna tvättning kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas.
- MONTERING AV SKYDDREMSA**

Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa det 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten. Knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT DET ALDRIG STÅ UTAN SKYDDREMSA LÄNGRE ÄN FEMTON SEKUNDER. Tillsätt 4-5 droppar halvpermanent monteringsmedium längs mittlinjen på varje objektglas. Sätt försiktigt skyddsremsan på plats och undvik luftfickor genom att försiktigt lägga ned skyddsremsan från objektglasets ena ände till den andra. OBSERVERA: Överflödigt monteringsmedium på objektglaset kan leda till hög bakgrundsfluorescens på grund av ljusspridning, eller brist på tydlig upplösning av celler (suddig bild). Överflödigt monteringsmedium kan avlägsnas från objektglaset genom att skyddsremsan försiktigt torkas med läskpapper eller linspapper. Undvik att röra direkt vid skyddsremsan.

TEKNISK HJÄLP: +1-916- 363-2649
eller e-mail: techservice@immunoconcepts.com

BIBLIOGRAPHY

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 (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *J. Biol. Chem.* 254:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzer, 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): Immunological 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., Swelly, 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 Counter-immunoelectrophoretic Method. *Clin. Exp. Immunol.* 22:9-15, 1975.
24. Wold, R. T., Young, F. E., Tan, E. M., et al. Deoxyribonucleic Acid Antibody: A Method to Detect its Primary Interaction With Deoxyribonucleic Acid. *Science* 161:806-807, 1968.
25. Ginsberg, B., Keiser, H. A Millipore Filter Assay for Antibodies to Native DNA in Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 16:199-207, 1973.
26. Schur, P. H., DeAngelis, D., Jackson, J. M. Immunological Detection of Nucleic Acids and Antibodies to Nucleic Acids and Nuclear Antigens by Counterimmunoelectrophoresis. *Clin. Exp. Immunol.* 17:209-218, 1974.
27. Crowe, W., Kushner, I. An Immunofluorescent Method using *Crithidia luciliae* to Detect Antibodies to Double Stranded DNA. *Arth. Rheum.* 20:811-814, 1977.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Simpson, L. Behavior of the Kinetoplast of *Leishmania tarentolae* Upon Cell Rupture. *J. Protozool.* 15:132-136, 1968.
35. 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.
36. Weller, T. H., Coons, A. H. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:789-794, 1954.
37. 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.
38. Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. *J. Rheum.* 2:215-220, 1975.
39. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. *J. Rheum.* 2: 167-171, 1975.
40. Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia luciliae* Method. *Arthritis Rheum.* 22:321-328, 1979.
41. Data on file. Immuno Concepts, Incorporated.

In the event of damage to the protective packaging, please contact Immuno Concepts prior to use.
 Si l'emballage de protection est endommagé, veuillez contacter Immuno Concepts avant toute utilisation.
 In caso di danni all'imballaggio protettivo, contattate Immuno Concepts prima dell'uso.
 En caso de daños al envoltorio protector, póngase en contacto con Immuno Concepts antes de usar el producto.
 Im Falle der Beschädigung der Schutzverpackung treten Sie vor Gebrauch bitte mit Immuno Concepts in Verbindung.
 Kontakta Immuno Concepts innan du använder produkten om skyddsförpackningen är skadad.



Manufacturer
 Constructeur
 Fornitore
 Fabricante
 Hersteller
 Fabrikant



Authorized Representative in the European Community
 Représentant autorisé dans le Communauté européen
 Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
 Representante autorizado en la Comunidad Europea
 Autorisierter Repräsentant in der Europäischen Gemeinschaft
 Auktoriserad Representant europeiska unionen



Temperature Limitation
 Limitation de la Température
 Limitazione Di Temperatura
 Limitación De la Temperatura
 Temperatur-Beschränkung
 Temperatur begränsning



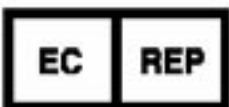
Contains Sufficient for <n> tests
 Contient suffisamment pour <n> essais
 Contiene sufficiente per <n> test
 Contiene suficiente para <n> pruebas
 Enthält genügendes für <n> Tests
 Innehåller tillräckligt för <n> test



Consult Instructions for Use
 Consultez les instructions pour l'usage
 Leggere le istruzioni per l'uso
 Consulte las instrucciones de uso
 Beachten Sie die Anwendungsvorschriften
 Se instruktionerna



In Vitro Diagnostic Medical Device
 Dispositif Médical Diagnostique In vitro
 Dispositivo Médico Diagnostico In vitro
 Dispositivo Médico De diagnóstico In vitro
 In-vitroMedizinische Diagnoseeinheit
 In Vitro diagnostiska medicinapparat



MDSS
 Burckhardtstr. 1
 30163 Hannover, Germany



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