



SISTEMA DI ANALISI IN FLUORESCENZA IgG ANTI-nDNA

Per uso diagnostico in vitro

Per Uso Professionale

USO PREVISTO:

Questo sistema di test è per uso diagnostico in vitro per il rilevamento qualitativo e la semi-quantificazione di anticorpi anti-nDNA della classe IgG nel siero umano mediante microscopia manuale a fluorescenza o con il microscopio semiautomatico a fluorescenza Image Navigator®. Questo sistema di test deve essere utilizzato come ausilio nella diagnosi del lupus eritematoso sistemico (LES) insieme ad altri risultati clinici e di laboratorio. Un operatore addestrato deve confermare i risultati generati con il dispositivo semiautomatico e il software Image Navigator®.

RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE

I pazienti con SLE (Systemic Lupus Erythematosus, lupus eritematoso sistemico) 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 (1). Gli anticorpi diretti contro l'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 anti-nDNA nel siero di pazienti con artrite reumatoide, sindrome di Sjögren, sclerosi sistemica progressiva, dermatomiositi, lupus eritematoso discoide e malattia mista del tessuto connettivo (2), 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 (3). Gli anticorpi anti-nDNA si presentano in titolo alto e, poiché si collegano all'attività della patologia (4), 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 (5-8). Il sistema di analisi IgG anti-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* (9). 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 (9-10). A micrografia elettronica, il cinetoplasto appare come una struttura a forma di disco, leggermente concava contenente la cresta mitocondriale ed una massa di DNA fibroso (11). 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 (12-16).

PRINCIPIO DEL TEST

Il sistema di analisi IgG anti-nDNA della IC utilizza il metodo dell'immunofluorescenza indiretta, descritto per la prima volta da Weller e Coons (17). 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'aiuto 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 anticorpi IgG anti-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 e conservato tra i 2-25°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 **SLIDE**: Catalogo n. 3007, 3014. Vetrini per substrato nDNA 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. La busta del vetrino viene riempita con un gas inerte non tossico che favorisce la stabilità delle cellule.

Controllo positive **CONTROL +**: numero di catalogo 3021. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpo specifico per antigeni nDNA. Questo siero dimostra una reazione positiva a colorazione brillante sul cinetoplasto del substrato *Crithidia luciliae* della Immuno Concepts.

Siero di controllo titolabile **TC**: numero di catalogo 3026. Fiala pronta per l'uso contenente 0,5 ml di siero di controllo umano positivo da trattare come campione del paziente, non diluito. Vedere l'etichetta della fiala per il range dei titoli.

Siero di controllo negativo **CONTROL -**: 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 Immuno Concepts.

Reagente anticorpo fluorescente **CONJFITC**: numero di catalogo 3009G (9,0 ml), 3075G (23 ml). Anti-IgG umana (catene gamma specifica) coniugata con FITC (fluorescein isothiocyanate, 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.

COMPONENTI NON REATTIVI

Tampone impregnato di polvere PBS **PWDRPBS**: 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 tra i 2-25°C, per massimo quattro settimane o fino a che non compaiono segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili.

Mezzo di fissaggio semipermanente **SOLNMM**: numero di catalogo 1111. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 5,0 ml di mezzo di fissaggio a base di glicerolo.

Vetrini coprioggetto **CVSLP**: numero di catalogo 1042. Ciascuna confezione contiene dieci vetrini coprioggetto 24 x 64 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

Contenitori con tappo a vite da un litro (per tampone PBS)

Timer da laboratorio

Microscopio a fluorescenza dotato di filtro eccitatore da 495 nm e filtro di sbarramento da 515 nm
Capsula di Petri o altra camera di incubazione

PRECAUZIONI

1. 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.
2. 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, 1999 Edition*.
3. La diluizione di componenti o la sostituzione di componenti diversi da quelli forniti in questo sistema può dare risultati non coerenti.
4. Il sodio azide (0,09%) 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.
5. Questo kit è per uso diagnostico *in vitro*.
6. 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.
7. 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.
8. Non fumare, non mangiare o non bere nelle aree in cui sono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
9. Evitare sempre gli spruzzi e la formazione di aerosol.
10. Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli specificati possono dare risultati falsi.
11. La contaminazione incrociata dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
12. 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.
13. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti, i vetrini e i campioni a temperatura ambiente (18-25°C).
14. Indossare guanti a perdere quando si maneggiano campioni e reagenti e dopo lavare accuratamente le mani.
15. La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
16. 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 (18-25°C). Non appena possibile, il siero deve essere separato dal coagulo per centrifugazione in modo da minimizzare l'emolisi.

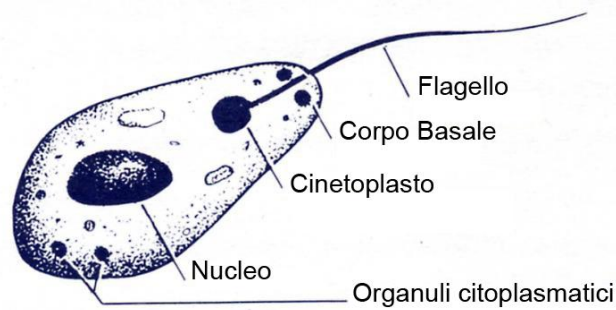
Sostanze interferenti: non vanno usati sieri che mostrano un alto grado di emolisi, ittero, lipemia o crescita microbica, perché queste condizioni possono provocare risultati falsi. Campioni contenenti sostanze particellari visibili vanno chiariti per centrifugazione prima dell'analisi.

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 DEL 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 del PBS devono essere eseguiti una sola volta per ogni prova. 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 1:10. Il primo pozzetto in cui è visibile una colorazione chiaramente distinguibile è il punto di equivalenza della reazione. Raccomandiamo questa tecnica per determinare i punti di equivalenza della reazione.

Il titolo medio e la gamma 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 degli anticorpi anti-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 IgG anti-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 la gamma 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 un 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 *Crithidia* 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 1:10. 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.

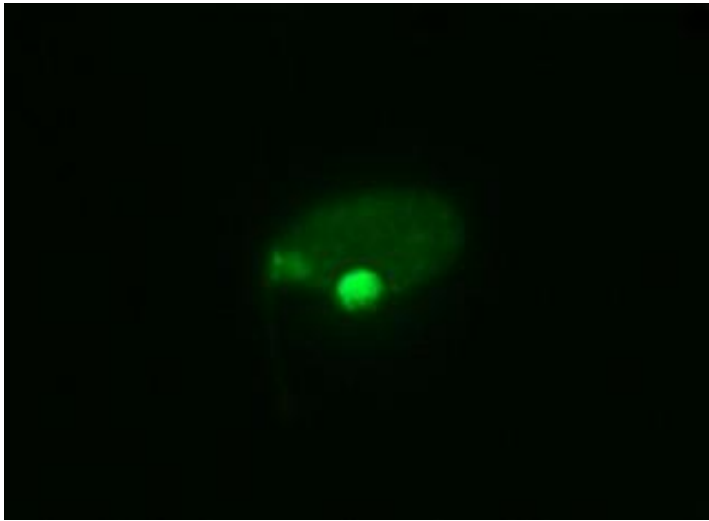
CARATTERISTICHE DELLA COLORAZIONE

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 (1) o, in caso di SLE precedentemente diagnosticata, patologia ricorrente o mancata risposta alla terapia (2-4).



Le immagini per la colorazione del nucleo, del corpo basale e del flagello rappresentano la colorazione considerata negativa per gli anticorpi anti-nDNA.

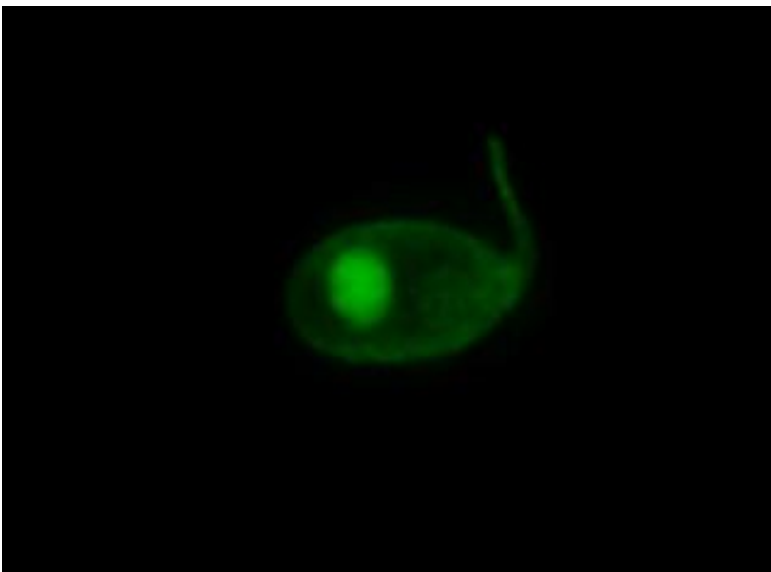
Nucleo: colorazione omogenea, periferica o a chiazze del nucleo.

Risultato: negativo per anticorpi anti-nDNA.

Antigeni: antigeni nucleari associati (2-4).

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 (18).



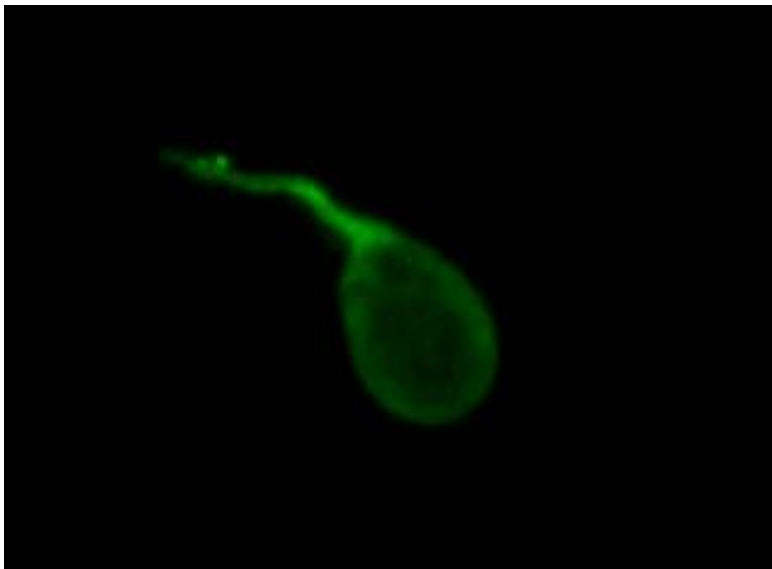
Flagello: colorazione del flagello dell'organismo.

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 (19-20).
4. Sebbene la presenza di anti-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 discoide e malattia mista del tessuto connettivo (2).

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 (21).

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 (19-20).

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il sistema di analisi in fluorescenza delle IgG anti-nDNA della Immuno Concepts fu confrontato con un altro sistema di analisi in fluorescenza IgG anti nDNA disponibile sul mercato. Il gruppo studiato consisteva di 121 campioni presentati a laboratori clinici per analisi anti-nDNA, 100 donatori di sangue e 2 standard O.M.S. noti per contenere anticorpi anti-nDNA. Tutti i campioni furono testati in parallelo sul meccanismo predicato e sul meccanismo soggetto. Sulla base di questo confronto, furono ottenuti i dati che seguono.

		Predicato	
		IgG anti-nDNA Test	
Immuno Concepts IgG anti-nDNA	Positivo	28	0
	Negativo	2	193

Questi dati producono le seguenti statistiche: concordanza percentuale positiva, 93,3% (28/30) [77,6 – 99,2%]; concordanza percentuale negativa, 100%, (193/193) [97,7 – 100,0%] ; concordanza complessiva, 99,1%, (221/223) [96,6 – 100,0%].

Uno dei due campioni “negativi falsi” era negativo per gli anticorpi antinucleari con immunofluorescenza indiretta con l'uso di cellule HEp-2 e non avrebbe soddisfatto i criteri di screening per le analisi anti-nDNA nella maggior parte dei laboratori clinici.

RIPRODUCIBILITÀ DEL TITOLO

Per definire la riproducibilità intrasaggio, un singolo siero anti-nDNA positivo fu testato in 30 replicati da un solo tecnico in una sola sequenza. I valori mediani e modali per questi dati erano 1:160, con un coefficiente geometrico di variazione dello 0,78%. La variabilità tra saggi fu definita esaminando i valori del titolo per un singolo siero anti-nDNA positivo mentre veniva elaborato in quindici diversi lotti dei kit. I valori mediani e modali per questi dati erano anch'essi 1:160, con un coefficiente geometrico di variazione dello 0,82%. Sia nelle analisi tra saggi che intrasaggi, tutti i valori dei titoli ricadevano più o meno entro una diluizione del mediano.

UTILIZZARE CON IMAGE NAVIGATOR®

Image Navigator® è il sistema microscopico semiautomatico di Immuno Concepts per la lettura dei vetrini nDNA fluorescenti. Confrontando l'Image Navigator® con la lettura convenzionale di vetrini fluorescenti di Crithidia luciliae, sono stati ottenuti i seguenti dati:

Vetrini con substrato di Crithidia luciliae (n=479):

Accordo positivo: 100,0% (55/55) [92,2 – 100,0%]

Concordanza negativa: 100,0% (424/424) [98,9 – 100,0%]

Accordo endpoint titolo: 100,0% (55/55) [92,2 – 100,0%]

È stata ottenuta una coorte di 172 campioni da pazienti a cui era stato precedentemente diagnosticato il LES. Tutti i campioni sono stati analizzati utilizzando i vetrini del substrato Crithidia luciliae della Immuno Concepts. In questa popolazione selezionata, la sensibilità diagnostica percentuale clinica per SLE era del 30,2% [23,8 - 37,5%] per la microscopia a fluorescenza convenzionale e del 30,2% [23,8 - 37,5%] per le letture del monitor Image Navigator®.

È stata ottenuta una coorte di 307 campioni da pazienti con malattie diverse dal LES. La specificità clinica era del 99,0% [97,0 – 99,8%] per la microscopia a fluorescenza convenzionale e del 99,0% [97,0 – 99,8%] per le letture del monitor Image Navigator®.

RIFERIMENTI

1. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
2. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann. Int. Med. 83:464-469, 1975.
3. Stingl, G., Meingassner, J. G., Swelty, P., et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and of Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin. Immunol. Immunopathol. 6:131-140, 1976.
4. Edmonds, J. P., Johnson, G. D., Ansell, B.M., et al. The Value of Tests for Antibodies to DNA in Monitoring the Clinical Course of Systemic Lupus Erythematosus. A Long Term Study Using the Farr Test and the DNA Counterimmunoelectrophoretic Method. Clin. Exp. Immunol. 22:9-15, 1975.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Crowe, W., Kushner, I. An Immunofluorescent Method using *Crithidia luciliae* to Detect Antibodies to Double Stranded DNA. Arth. Rheum. 20:811-814, 1977.
9. 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.
10. Simpson, L. Behavior of the Kinetoplast of *Leishmania tarentolae* Upon Cell Rupture. J. Protozool. 15:132-136, 1968.
11. 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.
12. 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.
13. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A. Current Status of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA) in Systemic Rheumatic Diseases. I: 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. J. Rheum. 2:215-220, 1975.
20. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. J. Rheum. 2:167-171, 1975.
21. Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia luciliae* Method. Arthritis Rheum. 22:321-328, 1979.

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



Fornitore



Rappresentante autorizzato
nella Comunità Europea



Limitazione Di
Temperatura



Contiene sufficiente per <n> test



Leggere le istruzioni
per l'uso



Dispositivo Medico Diagnostico In vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 3000G-I,

4.11.02.003.095-It

Rev 4.0 © Copyright 2023

PROCEDURA DI ANALISI IN FLUORESCENZA DEGLI nDNA-IgG

NOTA: Se il laboratorio sta utilizzando un preparatore automatico di campioni, si devono seguire la procedura e le raccomandazioni del produttore del preparatore stesso. Il preparatore di vetrini dovrebbe essere programmato affinché la diluizione dei campioni, la dispensazione dei volume e i tempi di incubazione siano appropriati come sottolineato di seguito.

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 2-25°C fino a quattro settimane.

2. DILUIZIONE DEI CAMPIONI DEI PAZIENTI

Screening: diluire i campioni dei pazienti a 1:10 aggiungendo 0,1 ml (100 µl) 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 µl) 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 µl/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. Aggiungere 1 goccia (20-25 µl) 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 ± 5 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°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 (± 5 minuti) a temperatura ambiente (18-25°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. 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 in eccesso. Riportare immediatamente il vetrino nella camera di incubazione e coprire completamente i pozzetti usando il reagente anticorpo fluorescente; iniziare mettendo una goccia su ogni pozzetto. Ripetere l'operazione per ciascun vetrino. Il reagente anticorpo fluorescente è

stato titolato al fine di compensare l'acqua deionizzata o distillata residua che resta sul vetrino dopo il risciacquo.

NOTA: è importante che i pozzetti dei vetrini non si asciughino durante questa procedura onde evitare il danneggiamento del substrato. **NON TAMPONARE O NON ASCIUGARE IL VETRINO IN MANIERA CHE LO STESSO NON RESTI SENZA REAGENTE ANTICORPO FLUORESCENTE PER PIÙ DI 15 SECONDI.**

9. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)

Mettere il coperchio sulla camera di incubazione e coprire con carta assorbente per impedire l'esposizione alla luce se la cella non è opaca. Lasciare incubare il/i vetrino/i per 30 minuti (± 5 minuti) a temperatura ambiente (18-25°C).

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. 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 (Opzionale). Tamponare il vetrino sul lato con carta bibula o con carta assorbente in modo da eliminare l'acqua in eccesso.

NON TAMPONARE O NON 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.

13. LETTURA DEL VETRINO

Se il vetrino deve essere letto tramite microscopia a fluorescenza convenzionale, può essere letto immediatamente, usando le procedure di laboratorio standard. I vetrini devono sempre essere esaminati da un operatore qualificato esperto nell'interpretazione di Crithidia lucillae fluorescenti. Per istruzioni sull'impiego del microscopio a fluorescenza si faccia riferimento al produttore dello strumento.

Per la lettura dei vetrini tramite sistema di cattura delle immagini e microscopio automatico di Image Navigator®, prodotti da Immuno Concepts, consultare il manuale dell'operatore per il sistema Image Navigator®. Image Navigator® deve essere utilizzato esclusivamente da personale esperto.

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

